Über die Wirkungsweise zweier wachstumsstimulierender Serumproteine aus fötalem Kälberserum auf Kulturen embryonaler Rattenzellen

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

JOSEPH VESER

aus Laupheim

1974

74 234

Über die Wirkungsweise zweier wachstumsstimulierender Serumproteine aus fötalem Kälberserum auf Kulturen embryonaler Rattenzellen

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

JOSEPH VESER

aus Laupheim

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 28. März 1974

Dekan : Prof. Dr. E. Bayer

1. Berichterstatter : Prof. Dr. W. Frank

2. Berichterstatter : Prof. Dr. W. Voelter

aku- Fotodruck, 86 Bamberg, Färbergasse 8 R

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden im Max-Planck-Institut für Virusforschung, Abteilung für Physikalische Biologie (Direktor: Professor Dr. H. Friedrich-Freksa) unter der Leitung von Professor Dr.Dr. Werner Frank in der Zeit vom März 1972 bis November 1973 in Tübingen durchgeführt.

Herrn Dr.Frank danke ich für die Übergabe des Themas sowie für zahlreiche Hilfestellungen in der Durchführung der Experimente.

Dank gebührt auch allen anderen, die in kameradschaftlicher Weise an dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Abkürzungen

AA	: Acrylamid
ACTH	: Adrenocorticotropes Hormon
AGLMe	: N-α- Acetylglycyl-L-Lysinmethylester
AS	: Ammoniumsulfat
Bis	: N,-N'-Methylenbisacrylamid
cAMP	: zyklisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat
Con A	: Concanavalin A
DNA	: Desoxyribonukleinsäure
DNFB	: Dinitrofluorbenzol
EDTA	: Titriplex III
FS	: Fötalserum
GuCl	: Guanidiniumchlorid
HA	: Hydroxylapatit
IAK	: Insulinantikörper
IEF	: Isoelektrische Fokussierung
IEP	: Isoelektrischer Punkt
KS	: Kälberserum
NSILA-S	: Non suppressible insulin-like activity-soluble
PBS/pH 6,8/pH 7,2	: 0,01 M Na-Phosphatpuffer; 0,14 M Natriumchlorid
Persulfat	: Ammoniumperoxodisulfat
PPO	: 2.5-Diphenyloxazol
POPOP - Dimethyl	: 2-p-Phenylen-bis(4 Methyl,5-Phenyl-oxazol)
RSA	: Rinderserumalbumin
Säuresed	: Sediment nach der Säurefällung mit 1 M Essigsäure
Säuresed UZ	: Sediment nach der Säurefällung nach Abtrennung der Lipoproteine
SDS	: Natriumdodecylsulfat
STH	: Somatotropes Hormon
TCA	: Trichloressigsäure

Temed : N,N,N',N',-Tetramethyläthylendiamin
Tris : Tris (hydroxymethyl)-aminomethan

INHALTSVERZEICHNIS

I) Einleitung und Problemstellung

II) Material und Methoden

1) Zellkulturen

2) Kulturmedium

3) ^{3}H-Methyl-Thymidin-Einbau in die Zellen

4) Autoradiographien

5) Isolierung der wachstumsstimulierenden Serumproteine S_1 und S_2 aus fötalem Kälberserum

a) Salzfällung mit Ammoniumsulfat und Säurefällung bei pH 4,9

b) Abtrennung der Lipoproteine durch Natrium - bromidgradientenzentrifugation

c) Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit

d) Sephadex G-150 Gelfiltration

6) Stickstoffbestimmungen

7) Molekulargewichtsbestimmungen

a) Streulichtmethode

b) Ultrazentrifugationsmethode

8) Elektrophoresen

a) Zonenelektrophorese auf Zelluloseacetat

b) Immunelektrophorese auf Agarose

c) Polyacrylamidgelelektrophoresen

d) Isoelektrische Fokussierung

9) Gewinnung der Antisera

10) Jodierung von S_1 mit ^{125}Jod-Natriumjodid

11) Insulinsepharose 4B Präparation

12) Glutaraldehydvernetztes Insulin

13) Radioimmunologische Insulinbestimmung

14) Radioimmunologische STH-Bestimmung

15) Gewinnung von Fettzellen und Fettzellghosts aus epididymalem Fettgewebe zur Bestimmung der Glukoseoxidation und Adenylatzyklase - aktivität

a) Gewinnung der Fettzellen

b) Glukoseoxidation

c) Gewinnung der Fettzellghosts

d) Adenylatzyklaseaktivitätsbestimmung

16) Untersuchung auf esterolytische Aktivität von S_1 und S_2

17) Proteolyseinhibitorische Aktivität von S_1 und S_2

III) Ergebnisse

1) Isolierung und Charakterisierung der wachstumsstimulierenden Serumproteine S_1 und S_2

2) Stimulierung der DNA - Synthese von embryonalen Rattenfibroblasten

3) S_1 als Trägerprotein für Insulin

4) Insulinbindung an S_1

5) Stimulierung der DNA-Synthese von embryonalen Rattenzellen mit S_1 und in Kombination mit Insulin

6) Effekte der wachstumsstimulierenden Serumproteine S_1 und S_2 auf intakte epididymale Fettzellen und Fettzellghosts

7) Untersuchung auf esterolytische und proteolytische Aktivität von S_1 und S_2

8) Spezifität von S_1 und S_2

IV) Diskussion

V) Literaturverzeichnis

VI) Lebenslauf

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Fast alle Säugetierzellen mit diploidem Chromosomensatz (Normalzellen) lassen sich in synthetischen Medien (1,2) kultivieren, jedoch ist für optimales Wachstum immer Serum zusätzlich nötig.
Permanent wachsende Zellen hingegen, die durch Spontantransformation aus Sekundärkulturen embryonaler Rattenzellen hervorgegangen sind, sind von der stimulierenden Wirkung des Serums für mindestens 3 Zellzyklen unabhängig (3). Die transformierten Zellen haben offensichtlich ein Wachstumsregulationssystem verloren, das für normale Zellen von physiologischer Bedeutung ist.

Neben der Initiierung der DNA-Synthese kommen dem Serum die wichtigen Eigenschaften zu, die Mitoserate anzuheben, der Topoinhibition entgegenzuwirken, für eine gute Haftung der Zellen an dem Kulturgefäß zu sorgen und irreversible, letztlich zum Zelltod führende Strukturveränderungen zu verhindern. Außerdem spielt Serum bei der Gestaltbildung der Zellen eine wichtige Rolle.

So berichteten Todaro und Mitarbeiter (4) über die Initiierung neuer Zyklusrunden kontaktinhibierter

3T3 Zellen durch Serum,
Dulbecco et al. (5) über irreversible Zellschäden und Zelltod von BMK, BHK, SV4C 3T3 und Py BHK Zellen nach Serumentzug,
Frank und Mitarbeiter (6,7,8,9) über die wachstumsstimulierende Wirkung von Serum bei embryonalen Rattenzellen ,
Clarke et al. (1o) und Lipton et al (11) über die Motilität von BHK 21 Zellen stimulierenden Serumfaktoren und Leffert et al. (12) über Haftsubstanzen für fötale Rattenhepatozyten aus Serum.
Temin (13,14) stellte fest, daß die für Enten-und Hühnerzellen essentiellen Serumfaktoren die Zellteilung von embryonalen Rattenzellen nicht stimulieren.

Inkubiert man embryonale Rattenzellen in serumfreiem Medium, so häufen sich die Zellen in der G_1-Phase an (6), wobei die intrazelluläre 3',5'-cAMP Konzentration erheblich ansteigt (15).
Grimm et al. (16) konnten zeigen, daß embryonale Rattenzellen, die 24 Stunden in Medium ohne Serum gehalten worden waren, die 32 fache Menge an cAMP, verglichen mit Zellen in Medium +10 proz. Kälberserum, enthalten. Die Zellen können durch Zugabe von Serum wieder zum Wachstum stimuliert werden. Dabei fällt innerhalb von 10 Minuten der cAMP-Gehalt der Zellen auf etwa ein Fünftel ab. Auch konnte nachgewiesen

werden, daß dieser Abfall nicht auf einer Abgabe des zyklischen Nukleotids in das Kulturmedium beruht (17); daher muß das vorhandene cAMP kurze Zeit nach Stimulierung der Zellen enzymatisch abgebaut werden. Das bedeutet, daß innerhalb kurzer Zeit die Enzymsysteme, die für die Gleichgewichtskonzentration des cAMP verantwortlich sind, aktiviert (Phosphodiesterase) bzw. gehemmt (Adenylatzyklase) werden müssen. Eine direkte Wirkung des Serums auf diese Systeme konnte in vitro nicht nachgewiesen werden. Jedoch kommt dem Calzium eine regulative Rolle zu. Bei einer Konzentration von 5×10^{-4} M Ca^{2+} besitzt die Phosphodiesterase in vitro ein Aktivitätsmaximum, während die Fluorid-stimulierte Adenylatzyklase fast vollständig gehemmt wird. Der für die in vitro Regulation beider Enzyme interessante Ca^{2+}-Konzentrationsbereich zwischen 1×10^{-4} M und 5×10^{-4} M ist gerade der Bereich, in dem auch die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration durch die Serumfaktoren reguliert wird (18). cAMP scheint also bei der Regulation des Wachstums von Säugetierzellen eine wichtige Rolle zu spielen. Otten (19) wies nach, daß bei vielen Zellsystemen die Wachstumsgeschwindigkeit der intrazellulären cAMP-Konzentration umgekehrt proportional ist.

Weiterhin hemmen Dibutyryl-cAMP und Blocker von Phospho-

diesterasen wie Theophyllin das Zellwachstum, wenn sie dem Kulturmedium zugesetzt werden.
So berichtete Sheppard (20,21), daß mit Py transformierte 3T3 Mausfibroblasten zu geringer Sättigungsdichte heranwachsen und bei Zugabe von Con A kaum agglutinieren, wenn dem Medium cAMP und Theophyllin zugesetzt werden.
Nach Otten (22) zeigten embryonale, mit einer temperatursensitiven Mutante von RSV (Rous Sarcoma Virus) infizierte Hühnerfibroblasten normale Morphologie bei 40,5 °C, bei 36°C jedoch die morphologische Charakteristik von transformierten Zellen. Gleichzeitig kann mit Temperaturabnahme ein cAMP-Abfall beobachtet werden. Wird kurz vor Temperaturwechsel cAMP und Theophyllin zugegeben, so konnten die Zellen ihre normale Morphologie erhalten.
Befunde von Frank (23) ergaben, daß Dibutyryl-cAMP die ^{3}H-Thymidininkorporation in embryonale Rattenzellen in Kultur zum selben Maß unterdrückt wie die Inkubation in serumfreiem Medium. Die Hemmung ist reversibel. Nach Entfernen des zyklischen Nukleotids vom Kulturmedium nehmen die Zellen die DNA-Synthese ca. 12 Stunden später wieder auf.

Wie vorher kurz erwähnt, sammeln sich nicht transformierte embryonale Rattenzellen nach Inkubation in serumfreiem Medium an einer bestimmten Stelle in der G_1-

Phase an (Abb. 1).

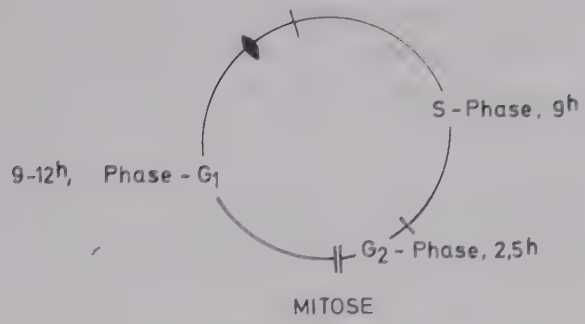


Abb. 1) Zellzyklus mit Angabe des Bereiches , in dem Normalzellen bei Inkubation in serumfreiem Medium angehalten werden.

Die kritische Phase dürfte kurz vor Beginn der DNA-Synthese liegen, da der Thymidineinbau und der Markierungsindex nach 3 Stunden, der Mitoseindex nach einem Intervall von 9 Stunden abfallen. In dieser Phase müssen die Zellen durch Komponenten des Kälberserums stimuliert werden, um weiter durch den Zellzyklus laufen zu können. Der Wiederanstieg des Thymidineinbaues nach Stimulierung durch diese aktivierenden Faktoren sollte ebenfalls nach 3 Stunden geschehen. Die lag-Phase ist aber erheblich länger; die Gründe hierfür sind noch unklar. Nach 8-10 Stunden werden

die Zellen aus dem Kompartment in den Zyklus stimuliert. Das Maximum des Markierungsindexes und Thymidineinbaues 18-21 Stunden nach Initiierung spricht eindeutig für eine teilweise Synchronisation der Zellpopulation, d.h. Auflaufen der Zellen an einer bestimmten Stelle des Zyklus.

In der vorliegenden Arbeit sollten die für die Regulation des Wachstums von embryonalen Rattenzellen essentiellen Serumbestandteile aus fötalem Kälberserum isoliert und charakterisiert werden. Weiterhin sollte der Wirkungsort studiert und die Wirkungsweise dieser wachstumsstimulierenden Serumproteine untersucht werden.

MATERIAL und METHODEN

Zellkulturen

Zur Herstellung von Kulturen embryonaler Rattenfibroblasten wurden die Rücken- und Extremitätenmuskeln 18-20 Tage alter Embryonen (Stamm Marshall) mit 0,25 proz. Trypsinlösung (Fa. Merck AG, Darmstadt) in Hanke's Puffer 30 Minuten bei 37°C inkubiert, die die Zellen durch eine sterile Gaze filtriert, niedertourig abzentrifugiert, in einem nach Angaben von Dulbecco (24) und Marcus (25) modifizierten Eagle-Medium, das 10 Prozent Kälberserum (KS) enthält, aufgenommen und in Roux-Flaschen ausgesät. Nach 30-60 Minuten wurde das Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt. Die Zellpopulation, die sich während dieser Zeit festsetzte, besteht zu über 90 Prozent aus Fibroblasten (26).

Für die Experimente wurden die Zellen in Plastikkulturschälchen (60/15mm, oberflächenbehandelt, Fa. Greiner, Nürtingen) in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/Schälchen angezüchtet und danach 24 Stunden in serumfreiem Medium gehalten. Dann wurden sie 18-21 Stunden in den entsprechenden Versuchsmedien inkubiert.

Kulturmedium

Zusammensetzung des Kulturmediums (mg/l):

NaCl	6400	L-Methionin	30
KCl	400	L-Phenylalanin	66
$CaCl_2x2H_2O$	265	L-Threonin	95
$NaH_2PO_4xH_2O$	125	L-Tryptophan	16
$MgSO_4x7H_2O$	200	L-Valin	94
$Fe(NO_3)_3x9H_2O$	0,1	L-Alanin	18
$NaHCO_3$	3700	L-Asparaginsäure	30
Phenolrot	5	L-Glutaminsäure	75
Glukose	4500	Glycin	100
Streptomycin	100	L-Prolin	25
Penicillin	150	L-Serin	21
Hypoxanthin	25	Biotin	0,1
L-Glutamin	580	Cholin	4
L-Cystin	48	Nicotinamid	4
L-Tyrosin	72	Ca-Pantothenat	4
L-ArgininxHCl	84	PyridoxalxHCl	4
L-HistidinxHClxH$_2$O	42	Thiamin	4
L-Isoleucin	105	Riboflavin	0,4
L-Leucin	105	i-Inosit	7
L-LysinxHCl	146	Folsäure	4

Alle Salze, Aminosäuren, Vitamine wurden von der Fa. Merck AG, Darmstadt, bezogen.

^{3}H-Methyl-Thymidin-Einbau in die Zellen

Die Zellen wurden nach dem Anzüchten in den Kulturschälchen für 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert, um sie in der G_1-Phase anzusammeln. Dann wurde das Medium abgesaugt und frisches, serumfreies Eagle-Medium zupipettiert, in dem die zu testenden Substanzen gelöst waren; die Kontrollen erhielten Medium mit 10 Prozent Kälberserum. Nach 18 - 21 Stunden wurde ^{3}H-Methyl - Thymidin (0,25 µCi / ml Medium; spezifische Aktivität: 5 Ci/mMOl; Konz: 1 mCi/ml, New England Nuclear Corporation, NEN) zugegeben, das Medium nach 60 Minuten abgegossen und der Zellrasen mit 3,0 ml kalter 7,5 proz. Trichloressigsäure (TCA, Fa. Merck AG, Darmstadt) fixiert. Nach 20 Minuten bei 4°C wurden die säureunlöslichen Zellbestandteile über Millipore Membranfilter (Porenweite 0,45 µ, SM 11306, Sartoriusmembranfilter GmbH, Göttingen) gesaugt und die radioaktiven Zerfälle in toluolhaltiger Szintillatorflüssigkeit (4 g PPO/ltr. Toluol; 2,5-Diphenyloxazol (PPO),Fa. Packard Instrument, Frankfurt; Toluol, Fa. Merck AG, Darmstadt) im Tricarb Spektrophotometer (Modell 3375, ^{3}H-Standardeinstellung; Modell 3003, Kanaleinstellung 50-1000, Fa. Packard) gezählt. Während der Versuchszeit wurden die Zellen

im Brutschrank bei 37°C in O_2/CO_2 angereicherter, wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert.

Der DNA-Gehalt wurde quantitativ mit der Indolmethode nach Keck (27) ermittelt. Für die Eichkurve wurde gereinigte Kalbsthymus-DNA (0,021 $EE_{260\ m\mu}$ = 1 γ DNA/ml) verwendet.

Autoradiographien

Für autoradiographische Analysen wurden die Zellen 1 Stunde mit ^{3}H-Methyl-Thymidin (0,25 µCi/ml Medium) markiert, in 5 proz. Glutardialdehydlösung (Fa. Merck AG, Darmstadt) fixiert, 30 Stunden gewässert und mit Ilford K 5 Nuclear Emulsion (Ilford Nuclear Research) überschichtet. Nach etwa 8 tägiger Expositionsdauer wurden die Photoschichten entwickelt und die Zellen mit Acridinorange (28) gefärbt.

Die Markierungsindices wurden durch Auszählen von 500 Zellen/Schälchen bestimmt.

Isolierung der wachstumsstimulierenden Serumproteine S_1 und S_2 aus fötalem Kälberserum (8,9)

Salzfällung mit Ammoniumsulfat und Säurefällung bei pH 4,9:

Alle Schritte wurden bei Temperaturen bis maximal 5°C durchgeführt.
1000 ml fötales Kälberserum (Microbiological Associates, Bethesda; Flow Laboratories, Rockville) wurden mit 313 g festem Ammoniumsulfat versetzt (pH der Lösung 7,2) und nach einstündigem Stehen zentrifugiert (Servallzentrifuge, 12000 g, 20 Minuten). Das 0-50 proz. Ammoniumsulfatsediment wurde in 200 ml bidest.Wasser gelöst und 60 Stunden gegen bidest. Wasser dialysiert. Dann wurde der pH-Wert mit 1 N Essigsäure (Fa. Merck AG, Darmstadt) auf pH 4,9 eingestellt, das Präzipitat bei 12000 g abzentrifugiert und in 30 ml PBS/pH 7,2 gelöst.

Abtrennung der Lipoproteine ($\rho \leq 1{,}21$ g/ml) durch Natriumbromidgradientenzentrifugation:

Die gegen PBS/pH 7,2 dialysierte Proteinlösung wurde mit Natriumbromid (Fa. Merck AG, Darmstadt) auf die Dichte von 1,21 (refraktometrische Kontrolle mit Abbe-Refraktometer) eingestellt und in Polyallomer-

bechern in der Spinco Ultrazentrifuge L-2 65 B (Beckman Instruments, Inc., Belmont, California, SW-40 Rotor, 40000 UpM, 48 Stunden, 5°C) zentrifugiert. Die flotierenden, inaktiven Lipoproteine (29,30) wurden abgetrennt und verworfen. Es konnte kein nennenswerter Verlust an Gesamtaktivität festgestellt werden (Tab.1).

Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit:

Die unterschiedliche Adsorption von Serumproteinen an Hydroxlapatit (31,32) wurde zur weiteren Auftrennung ausgenützt.
Hierzu wurde Hydroxylapatit (HA, Biogel HTP für Säulenchromatographie, Bio Rad Laboratories, Richmond, California) in 0,005 M Phosphatpuffer/pH 6,8 mehrmals aufgeschlemmt und nach Einfüllen in eine K 26/40-Säule (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala) gegen 0,005 M Phosphatpuffer/pH 6,8 äquilibriert. 10 ml Säurepräzipitatlösung wurden nach Dialyse gegen die Ausgangspufferlösung auf die Säule aufgetragen. Eluiert wurde mit einem diskontinuierlichen Salzgradienten (Stufen: 0,005 M, 0,08 M, 0,12 M, 0,16 M, 0,2 M, 0,5 M Natriumphosphatpuffer/pH 6,8). Die aus 1000 ml Fötalserum gewonnenen, mit 0,12 M und 0,5 M Phosphatpuffer/pH 6,8 eluierten Proteinfraktionen wurden in der Diaflo-Ultrafiltrationszelle (Modell 402, Diaflo-

Ultrafiltrationsmembran PM 10, Ø 76 mm, Amicon N.V., Oosterhout, Holland) auf je 40 ml eingeengt und gegen PBS/pH 7,2 dialysiert.

Sephadex G-150 Gelfiltration:

Zur Gelfiltration an Sephadex G-150 wurden 20 ml (≙ 500 ml FS) der gegen PBS/pH 7,2 dialysierten, mit 0,12 M bzw. 0,5 M Phosphatpuffer/pH 6,8 eluierten Proteinfraktion, auf eine K 50/100 Chromatographiesäule (Pharmacia, Uppsala) aufgetragen und mit PBS/pH 7,2 eluiert. Beide Fraktionen wurden in der Ultrafiltrationskammer (Amicon, Modell 402 , Filtertyp PM 10) auf je 20 ml konzentriert. Sephadex G-150 (Pharmacia) wurde 7 Stunden bei 80°C gequollen, im Exsiccator entlüftet und gegen PBS/pH 7,2 äquilibriert. Vor und nach jedem Isolierungsschritt wurden die Proteinfraktionen in der Ultrazentrifuge (Spinco, Modell 150, 30 C Rotor, 30000 UpM, 20 Minuten) zentrifugiert und die wachstumsstimulierende Aktivität im ^{3}H-Methyl-Thymidineinbau getestet.

Stickstoffbestimmungen

Die biologischen Aktivitäten der Proteinfraktionen wurden auf der Basis ihrer Stickstoffgehalte errechnet,

die in einer Mikro-Kjeldahl-Apparatur bestimmt wurden (33).

Molekulargewichtsbestimmungen

Streulichtmethode:

Die Intensität des Streulichts war Meßgröße bei der Bestimmung des Molekulargewichtes im Brice-Phoenix-Differentialrefraktometer nach $K_c/R_\phi = 1/M + 2BC$ (34, 35).

K_c, B : optische Konstanten

R_ϕ : Intensität des gestreuten Lichts

M : Molekulargewicht

C : Konzentration der Lösung in g/ml.

Ultrazentrifugationsmethode:

Aus Diffusions-, Sedimentations- und Gleichgewichtsläufen in der analytischen Spinco-Ultrazentrifuge, Modell E (Monochromator, Photometer) konnten bei verschiedenen Proteinkonzentrationen und Rotorgeschwindigkeiten (4600, 8000, 12000, 59700 UpM) die Sedimentationskonstanten bzw. Molekulargewichte ermittelt werden. Folgende Mittelwerte von Proteindichten wurden eingesetzt: ρ in PBS (g/cm^3) : 1,390

ρ in 6 M GuCl (g/cm^3) : 1,405

Elektrophoresen

Zonenelektrophorese auf Zelluloseacetat:

Die Zonenelektrophorese wurde auf einer Zelluloseacetatmembran (Format 57/145 mm, SM 112000, Sartoriusmembranfilter GmbH, Göttingen) in einer IEP-Apparatur (Modell R-101, Beckman bzw. Boskamp-Ikropho) ausgeführt.

Färbebad: 9 Vol. Methanol, 1 Vol. Eisessig, 1 proz. Amidoschwarz 10 B;

Entfärbelösung: 9 Vol. Methanol, 1 Vol. Eisessig;

Fixierzeit: 5 Minuten;

Nach der Fixierung wurde die Membran mit Methanol 1 Minute gewaschen, 1 Minute in das Transparenzbad (7 Vol. Dioxan, 3 Vol. Isobutanol) gelegt und auf einer Glasplatte bei 100°C getrocknet.

Elektrophoresebedingungen: 3 mA/250 V, 30 Minuten

Elektrodenpuffer : 0,05 M Na-Phosphatpuffer, pH 7

Immunelektrophorese auf Agarose:

1,5 g Agarose (Serva, Feinbiochemica, Heidelberg) wurden in 100 ml Veronalpuffer/pH 8,6 (17,6 g Veronal, 98,4 g Na-Veronal, ad 4 ltr., 1:4 verdünnen) bei 80°C gelöst und davon 4 ml auf einen Objektträger

gegeben. Nach der Elektrophorese wurden zur Entwicklung der Präzipitationsbanden Antikörper gegen Säuresediment UZ, S_1, S_2 und α_2-Makroglobulin-Schultze in die in Stromrichtung aus dem Agar gestanzte Rinne gefüllt. Die Präzipitationsbanden wurden über Nacht deutlich ausgebildet.

Elektrophoresebedingungen: 5 mA/300-400 V; 1,5-2 Stdn.

Elektrodenpuffer : 0,05 M Veronalpuffer/pH 8,6

Polyacrylamidgelelektrophoresen (36,37,38):

Die Polyacrylamidgelelektrophoresen (Rundgele) wurden in 5-7,5 proz. Acrylamidgelen, 0,2 proz. an Bismethylenacrylamid durchgeführt:

pH der Konzentr.	pH der Trennung	Trenngellösungen	Sammelgellösungen
8,3	9,5	pH 8,9	pH 6,9
		1) 1 N HCl 48 ml Tris 36,6 g Temed 0,46 ml	4) 1 M H_3PO_4 25,6 ml Tris 5,7 g Temed 0,46 ml
		2) AA 5%, 7,5% 20 g,30 g Bis 0,8 g	5) AA Io g Bis 2,5 g
		3) Persulfat 0,28g	6) Riboflavin 8 mg 7) Saccharose 20 g

Mischungsverhältnis des

Untergels:	Obergels:
1 Teil Nr.1	1 Teil Nr.4
2 Teile Nr.2	2 Teile Nr.5
1 Teil H_2O bidest.	1 Teil Nr.6
4 Teile Nr.3	4 Teile Nr.7

Elektrodenpufferlösung/pH 8,3:

Bestandteile pro 1000 ml Lösung: Tris 6,0 g
Glycin 28,8 g

zum Gebrauch: 10 proz. wässrige Lösung

Färbelösung: 500 ml Methanol, 500 ml H_2O, 100 ml Eisessig, 0,1 proz. Amidoschwarz 10 B bzw. 7 proz. Essigsäure, 0,1 proz. Amidoschwarz

Entfärbelösung: 7 proz. Essigsäure

Frontmarker: 0,01 proz. Bromphenolblaulösung

Harnstoffgele waren 6 M an Harnstoff.

Elektrophoresebedingungen: 5 mA/Röhrchen, 2-3 Stunden; (Polyacrylamid-Rundgelelektrophorese, Netzanschlußgerät Desaga, Modell 121260, Fa.Desaga GmbH, Heidelberg).

Amidoschwarz 10 B, Bromphenolblau pH 3 - 4,6, Eisessig, Harnstoff, Methanol, Saccharose und Tris wurden von

der Fa. Merck AG, Darmstadt, AA, Bis, Riboflavin und Temed von der Fa. Serva, Feinbiochemica, Heidelberg und Glykokoll und Persulfat von der Fa. Riedel-De Haen, Seelze-Hannover, geliefert.

Isoelektrische Fokussierung (IEF):

Die Elektrophorese wurde in Anlehnung an Godson (39) und Schmincke (40) in einem U-Rohr durchgeführt. Die Elektrophoresekammer enthielt als Anoden - und Kathodenflüssigkeit 0,1 proz. H_2So_4. Das U-Rohr war über Platindrahtbrücken leitend mit der Anoden - und Kathodenkammer verbunden. Die mittlere Zone des ⊖ Schenkels (Abb. 2) enthielt die Ampholinelösung (Carrier Ampholytes, pH 4-6, LKB Producter, Schweden), die durch einen Saccharosegradienten (5-40 proz. Saccharose) stabilisiert war. Proteine lassen sich je nach ihrem isoelektrischen Punkt (IEP) in dem sich hier ausbildenden pH-Gradienten auftrennen. Als Anodenflüssigkeit diente 1 proz. Phosphorsäure in 40 proz. Saccharose, als Kathodenflüssigkeit 0,1 N Natronlauge. Zu der 5 proz. und 40 proz. Saccharose wurden vor dem Mischen mit dem Gradientenmischgerät je 0,1 ml Ampholine und je 0,1 ml Substanzlösung pipettiert. Die Arbeitstemperatur betrug 4°C. Es wurde mit Spannungen von 400 - 1200 V (ca. 1 Watt) und Elektrophorosezeiten

von 10-16 Stunden gearbeitet. Als Spannungsgeber diente LKB DC Power Supply 2371 D.

Zur Abnahme des Gradienten wurde in den ⊕ Schenkel eine 40 proz. Saccharoselösung gedrückt und die einzelnen Fraktionen vor der pH-Messung mit je 1,0 ml bidest. Wasser verdünnt.

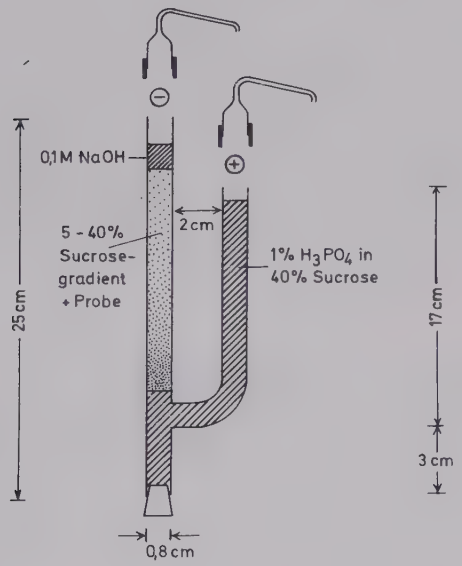


Abb. 2) U-Rohr für die isoelektrische Fokussierung.

Gewinnung der Antisera

Zur Gewinnung der Antisera gegen Säuresediment UZ, S_1 und S_2 wurden Kaninchen mit den entsprechenden Fraktionen immunisiert. 0,5 ml (0,5 - 1,0 mg/ml) der Fraktionen wurden mit gleichem Volumen Freund Adjuvans (Bacto Adjuvant, complete Freund, Difco Lab., Detroit) emulgiert und intramuskulär injiziert. 14 und 18 Tage später wurde mit je 0,5 ml Substanzlösung geboostert. Den Kaninchen wurde Blut entnommen und die gewonnenen γG-Immunoglobuline wurden durch Ammoniumsulfatpräzipitation nach (41) angereichert. Immunodiffusionstests wurden nach Ouchterlony in 1,5 proz. Agarose/PBS + 0,5 proz. Phenol durchgeführt.

Jodierung von S_1 mit ^{125}Jod-Natriumjodid

Bei der Markierung von S_1 mit dem Radioisotop ^{125}Jod-Natriumjodid nach Greenwood und Hunter (42,43,44) stand eine Methode zur Verfügung, die keinen Aktivitätsverlust (Tab.5) im Gegensatz zu Reaktionen mit ^{3}H-Dinitrofluorbenzol und ^{14}C-Phenylsenföl (45,46) ergab (Tab.5). Die immunologische Reaktivität nach der Markierung soll nach Hunter nicht beeinträchtigt werden. Die Reaktion wurde in dem mit einem Gummi-

stopfen verschlossenen, das Radioisotop enthaltenden Gefäß durchgeführt.

Zu 5 mCi ^{125}Jod-Natriumjodid (50 µl, spez. Akt.: 14 mCi/µg Jod, Amersham, Buchler) wurden mittels einer Kanüle das gegen 0,05 M Phosphatpuffer/pH 7,5 dialysierte Serumprotein S_1 (1 mg; 0,1 ml) und frisches Chloramin (0,145 mg; 0,072 ml einer 0,2 proz. Lösung in 0,05 M Phosphatpuffer/pH 7,5; Fa. Merck AG, Darmstadt) injiziert. Nach leichtem Schütteln und 1 min. Stehen wurden 0,1 ml einer 0,4 proz. Natriumbisulfitlösung zum Schutz vor einer oxidativen Zerstörung des Proteins und zur Verhinderung einer Jodierung von SH-Gruppen und Histidin zugegeben. Das freie ^{125}J-Jodid wurde mit 0,4 ml einer 1 proz. Kaliumjodidlösung verdünnt. Die Trennung des Reaktionsproduktes von der Reaktionsmischung erfolgte auf einer Sephadex G-50 Säule (K 35/40). Elutionsmittel war PBS/pH 7,2. Um eine möglichst quantitative Wiedergewinnung des jodierten Proteins (0,2 - 0,4 Mol ^{125}Jod/Mol S_1) zu erzielen, wurde das Gel mit 348 mg Rinderserumalbumin (RSA) vorbehandelt.

Insulinsepharose - 4B Präparation

Insulin wurde über die ε - Aminogruppe von Lysin (B-Kette, Aminosäure 29) an Sepharose 4B gekuppelt (47,48,49). Unter dem Abzug wurden 10 ml

abgesetzte Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala) mit gleichem Volumen bidest. Wasser und 0,5 g Cyanogenbromid (EGA Chemie KG, Steinheim) in einem mit Magnetrührer ausgestatteten Titrationsgefäß gemischt und am Radiometer der pH-Wert mit 2 N Natronlauge mit einer Radiometer-Autobürette konstant bei pH 11 gehalten. Die Temperatur sollte 20°C nicht übersteigen (Zugabe von Eiswürfeln). Nach Reaktionsende wurde das Gel rasch mit 2 ltr. eiskalter 0,1 M $NaHCO_3$-Lösung, pH 9,0,in einer Glasfritte gründlich gewaschen und das aktivierte Reaktionsprodukt in ein kleines Becherglas überführt. Danach wurden 10 ml einer 0,4 proz. Rinderinsulinlösung in 0,1 M $NaHCO_3$-Puffer/pH 9,0 zugegeben. Obwohl die Kupplungsreaktion nach 2-3 Stunden beendet ist, wurde bis zur vollständigen Inaktivierung reaktiver Sepharosegruppen 16-24 Stunden bei 4°C leicht gerührt. Die substituierte Sepharose wurde dann mit großem Volumen Wasser, 0,1 M $NaHCO_3$-Puffer, 0,5 M NaCl-lösung und PBS/pH 7,2 gewaschen, bis keine Absorption bei 280 mμ im Filtrat mehr nachweisbar war. Unter aufgeführten Versuchsbedingungen wurden 360 μg Insulin/ml Sepharose gebunden.

Glutaraldehydvernetztes Insulin

In Anlehnung an Heinzel et al. (50) wurde Rinderinsulin (krist., rein, 23 IE/mg, Zn-Gehalt 0,4 Prozent,

Fa. Serva, Feinbiochemica, Heidelberg) mit Glutardialdehyd (25 proz., Fa.Merck AG, Darmstadt) zu löslichen Aggregaten vernetzt, deren mittleres Molekulargewicht nach Literaturangaben etwa 280000 D betrug.

4 ml einer Lösung von krist. Rinderinsulin (1 proz., in 0,05 M Imidazolpuffer/pH 7,0) wurden mit 0,08 ml einer 25 proz. Glutardialdehydlösung gemischt und der pH-Wert auf 7,0 zurückgestellt. Nach 48 stündigem Rühren bei 4°C wurde die fahlgelbe Lösung zentrifugiert und zur Beseitigung von Aldehydgruppen 24 Stunden gegen eine 0,1 proz. Hydroxylammoniumchloridlösung (Fa.Merck AG, Darmstadt) dialysiert. Nach 48 stündiger Dialyse gegen PBS/pH 7,2 wurde das Volumen in einer Diafloultrafiltrationszelle (Modell 12, Membran PM 10, Amicon N.V., Holland) auf 2 ml eingeengt.

Die Reaktionsmischung wurde zur Abtrennung von freiem Insulin einer Sephadex G-100 Fraktionierung unterzogen. Elutionsmittel war PBS/pH 7,2 (K 25/100 Säule, Pharmacia, Uppsala).

Radioimmunologische Insulinbestimmung

Der Insulingehalt des Serumproteins S_1 wurde nach Modifizierung der ursprünglich von Hales und Randle (51) beschriebenen Doppelantikörpertechnik bestimmt. Prinzip dieser immunologischen Insulinmeßmethodik ist die Kompetition von Insulin mit ^{125}Jod-Insulin um eine begrenzte Zahl spezifischer Antikörperbindungsstellen. Die Radioaktivität des Antigen-Antikörper-Komplexes ist der Insulinkonzentration der Probe reziprok. Der Insulingehalt wurde auf eine Insulinstandardkurve bezogen.

Präparation der Insulinstandardkurve:

Der hierfür benötigte Reagenziensatz wurde von der Fa. Schwarz/Mann, Biochemicals, New York, geliefert.

Zu 0,4 - 20 µE Insulin-Standardlösungen wurden bei 2-4 °C 100 µl Insulinbindungsreagens (vorinkubierte Mischung von Schweine-anti Insulin-serum und anti γ-Globulin-Schweineserum), 6 Stunden später 100 µl ^{125}Jod-Insulin zupipettiert. Nach weiteren 18 Stunden bei 2-4 °C wurde das Präzipitat über Filterblättchen aus regenerierter Zellulose (SM 11606, Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen) gesaugt, mit 0,04 M Na-Phosphatpuffer/pH 7,4 , 0,5 proz. an RSA, gewaschen, bei 80°C getrocknet und nach Zugabe von 5 ml

Toluolszintillator die Radioaktivität im Tricarb-spektrophotometer bestimmt. Der % Anteil an gebundenem ^{125}Jod-Insulin wurde auf halblogarithmischem Papier gegen µE Insulin/Ansatz aufgetragen.

$$\% \text{ gebundenes } ^{125}\text{Jod-Insulin} = \frac{\text{Standardimpulse} \times 100}{\text{Kontrolle}}$$

Eine lineare Funktion wurde im Bereich von 1-10 µE Insulin erhalten (Abb. 3).

Testansatz:

0,04 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,4, (µl)	Standard (µE Insulin)	Bindungs-reagens 6 Stdn., (µl)	^{125}J-Insulin 18 Stdn., (µl)
L: 200	---	---	100
S: 100	---	100	100
100	0,4	100	100
100	1,0	100	100
100	2,0	100	100
100	3,0	100	100
100	5,0	100	100
50	10,0	100	100
---	20,0	100	100
K: --	---	---	100

L: Leerwert;
S: Standard;
K: Kontrolle;

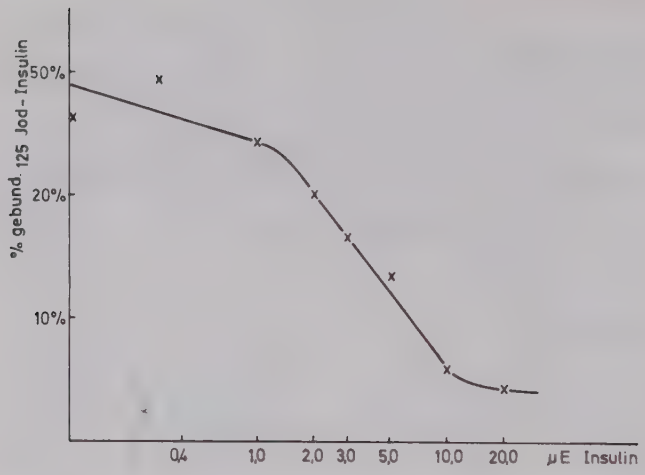


Abb.3) Standardkurve zur quantitativen radioimmunologischen Bestimmung von Insulin.
Der Betrag von gebundenem ^{125}Jod-Insulin wurde in Prozent der Kontrolle angegeben. Jeder Punkt ist das Mittel 2 Einzelmessungen.

Radicimmunologische STH - Bestimmung

Zur Untersuchung auf möglicherweise an S_1 und S_2 gebundenes Wachstumshormon wurde, wie bei Pennisi (52) und Molinatti (53) beschrieben, verfahren. Sie verwendeten eine radioimmunologische Methode, welche sich nur in der zeitlich späteren Zugabe des präzipitierenden Antikörpers zum Testansatz von der immunologischen Insulinbestimmung unterscheidet. Auch hier ist die Radioaktivität des Antigen-Antikörper-Komplexes der

STH-Konzentration der Probe reziprok. Der STH-Gehalt wurde auf eine STH-Standardkurve bezogen.
Die Reagenzien stammten von Schwarz/Mann, Biochemicals, New York.

Präparation der STH - Standardkurve:

Zu 100 µl 0,13 M Boratpufferlösung/pH 8,4, 5 proz. an RSA und 0,02 M an EDTA wurden 5-100 µl Standardlösung (0,05 - 1 mµg STH) und 100 µl STH-Schweineantiserum zupipettiert und 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden zum Inkubationsansatz 100 µl ^{125}Jod-STH zugegeben. 20-24 Stunden später wurden 100 µl präzipitierende Antikörperlösung (Kaninchen-anti γ Globulin-Serum) zupipettiert. Nach weiteren 18-24 Stunden bei 4°C wurde das Präzipitat auf Filterblättchen aus regenerierter Zellulose (SM 11606, Sartorius Membranfilter GmbH) gesaugt, mit 0,13 M Boratpufferlösung, 0,5 proz. an RSA, gewaschen, bei 80°C getrocknet und nach Zugabe von 5 ml Toluolszintillator die Radioaktivität im Spektrophotometer gemessen.
Der % Anteil an gebundenem ^{125}Jod-STH wurde auf halblogarithmischem Papier gegen mµg STH/Ansatz aufgetragen. Eine lineare Funktion wurde im Bereich von 0,1 - 1,0 mµg STH erhalten (Abb. 4).

$$\% \text{ gebundenes } {}^{125}\text{Jod-STH} = \frac{\text{Standardimpulse} \times 100}{\text{Kontrolle}}$$

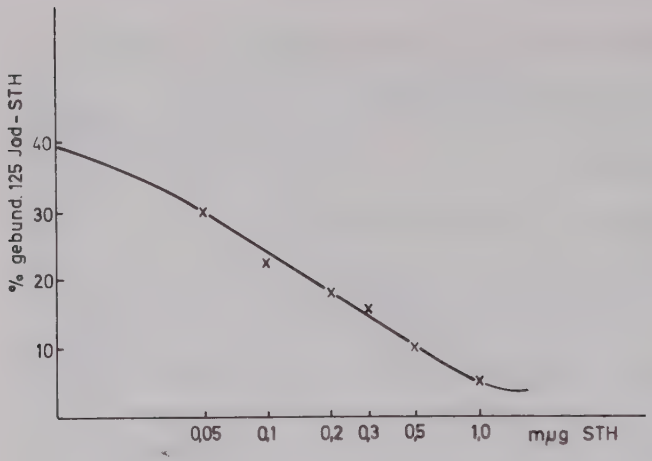


Abb. 4) Standardkurve zur quantitativen radioimmunologischen Bestimmung von STH .
Der Betrag von gebundenem ^{125}Jod-STH wurde in Prozent der Kontrolle angegeben. Jeder Punkt ist das Mittel 2 Einzelmessungen.

Gewinnung von Fettzellen und Fettzellghosts aus epididymalem Fettgewebe zur Bestimmung der Glukoseoxidation und Adenylatzyklaseaktivität.

Gewinnung der Fettzellen:

Männliche Wistar-Ratten (90 - 120 g) wurden dekanitiert und die Nebenhodenfettkörper herauspräpariert. Daraus wurden die Fettzellen in Anlehnung an Rodbell (54) isoliert. Das Puffersystem wurde nach Heptner (55) und Gliemann (56) modifiziert.

3,5 mg Kollagenase (Worthington) wurden in 2 ml Trispuffer/pH 7,8 gelöst und 900 mg Nebenhodenfettgewebe zugegeben. Nach kurzer Begasung mit Carbogen (95 proz. O_2/5 proz. CO_2) und einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die isolierten Zellen durch Nylongewebe in ein Zentrifugenglas gegossen. Man zentrifugierte 15 Sekunden bei 200 g und wusch mit Trispuffer/pH 7,2 , der 2 g Albumin (Schweizerisches Rotes Kreuz, Bern) und 10 mg Glukose je 100 ml enthielt. Das Zellpräzipitat wurde in 20-25 ml des gleichen Puffers aufgenommen und suspendiert. Die Zellen wurden in einer Neubauerkammer gezählt.

Glukoseoxidation:

Die Stimulierung der Oxidation von 1-^{14}C-Glukose durch Fettzellen wurde bestimmt wie unter (57) beschrieben. Der Ansatz zur Messung der $^{14}CO_2$-Produktion enthielt: 0,55 ml Pufferlösung/pH 7,2 (0,06 M NaCl, 0,008 M K_2HPO_4, 0,02 M Tris, 5 mM Glukose, 2,5 mµCi 1-^{14}C-Glukose, 10 mg Albumin); 0,5 ml Zellsuspension mit ca. $1x10^6$ Zellen; 0,1 ml der zu testenden Substanz; 0,1 ml einer 0,025 mM Bikarbonatlösung. Nach Zugabe der $NaHCO_3$-Lösung betrug der pH-Wert des Ansatzes 7,5. Nach 2 Stunden bei 37°C unter konstanter Schüttelbewegung wurde das System mit 0,2 ml 10 proz. Schwefelsäure gestoppt, das $^{14}CO_2$ in 0,4 ml Phenyläthylamin

absorbiert und die Radioaktivität nach Überführen in Bray Szintillationszähler (7 g PPO, 0,3 g POPOP-Dimethyl, 20 ml Äthylenglykol, 100 g Naphthalin, 100 ml Äthanol ad 1 ltr. Dioxan, Fa. Merck AG, Darmstadt) im Tricarbspektrophotometer gemessen.

Gewinnung der Fettzellghosts:

Fettzellghosts, isoliert aus epididymalem Fettgewebe, wurden nach Rodbell (58) präpariert.
Die Fettzellen wurden mit Lysepuffer, der sich aus 2,5 mM ATP, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,1 mM $CaCl_2$, 0,1 mM NAD, 0,05 mM NADP und 1 mM $KHCO_3$, pH 7,2 , zusammensetzte, lysiert. Das mehrmals mit hypotonem Lysepuffer gewaschene 900 g Sediment wurde als Ghostfraktion verwendet.

Adenylatzyklaseaktivitätsbestimmung:

Die Adenylatzyklaseaktivität wurde nach Hepp und Renner (59) geprüft.
Der Testansatz enthielt 20 mM Tris - HCl, pH 7,4 4,5 mM $MgCl_2$, 1 mM 3',5'-cAMP, 0,45 mM α-^{32}P-ATP, 10 mM Kreatinphosphat, 30 µg Kreatinkinase, 20 µg Humanserumalbumin und Testsubstanzen.
Nach Zugabe von Ghosts zum Ansatz wurde 10 Minuten bei 37°C inkubiert und danach die Reaktion in

siedendem Wasserbad gestoppt. Die Adenylatzyklase-aktivität wurde in nMol gebildetem ^{32}P-cAMP x Min^{-1} x g^{-1} Protein angegeben (60).
Die Proteinkonzentrationen wurden mit der Mikro - Biuret - Methode ermittelt (61).

Untersuchung auf esterolytische Aktivität von S_1 und S_2-

Die Untersuchung auf esterolytische Aktivität von S_1 und S_2 wurde photometrisch nach Johnson (62) und Siegelmann (63) durchgeführt (Abb. 5).
Prinzip der enzymatischen Reaktion ist die Freisetzung von Methanol aus N-α-Acetyl-L-Lysinmethylester (Div. Travenol Lab., Inc., California).

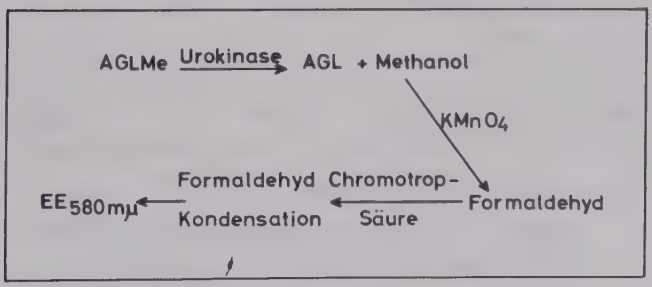


Abb. 5)

Die esterolytische Aktivität wurde auf eine Standard-urokinasepräparation (5000 Einheiten/Ampulle, human urine, Nutritionals Biochemicals, Corporation, Cleveland, Ohio) bezogen (Abb.6 und 7).
1 Urokinaseeinheit setzt danach $3{,}1 \times 10^{-4}$ µMol N-α-Acetylglycyl-L-Lysinmethylester/Min. um.

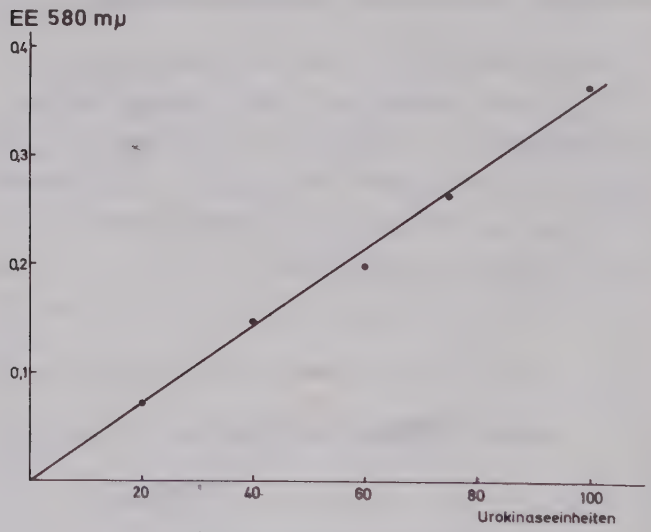


Abb. 6) Urokinasestandardkurve

Enzymkonzentration: 20 - 100 E Urokinase/0,2 ml
Substratkonzentration: 3,5 mg AGLMe/ml

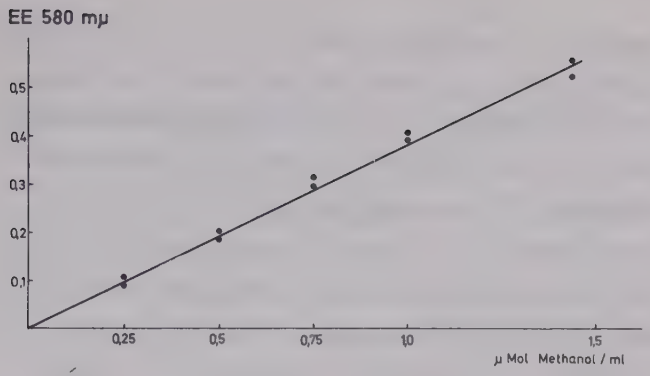


Abb. 7) Methanolverdünnungskurve zur Kalibrierung der Urokinase

Proteolyseinhibitorische Aktivität von S_1 und S_2

Zur Untersuchung der proteolyseinhibitorischen Aktivität von S_1 und S_2 wurde die Hemmung der Proteaseaktivität von Trypsin und Pronase in einer Zeitkinetik über 5 Stunden verfolgt.
Im Inkubationsansatz waren 0,5 ml PBS/pH 7,2 , 0,01 μCi ^{125}Jod-Humanserum-Albumin (spez. Akt.: 2,5 μCi/mG; Konz.: 50 μCi/ml, Amersham, Buchler), Proteaselösung und Substanzlösung enthalten. Nach 0, 1, 2 und

5 stündiger Inkubationszeit bei 37°C wurde die Reaktion mit 1 ml 7,5 proz. TCA gestoppt; 20 µl einer eiskalten Albuminlösung (1 mg/ml, Rinderserumalbumin, Fa. Serva, Feinbiochemica, Heidelberg) wurden zur vollständigen Fällung nicht hydrolysierten, radioaktiven Albumins zupipettiert. Nach einstündigem Stehen bei 4°C wurde in der Tischzentrifuge abzentrifugiert; 0,5 ml des Überstandes wurden in Dioxanszintillator (10 g PPO, 100 g Naphthalin auf 1 ltr. Dioxan) überführt und die radioaktiven Zerfälle im Tricarb Spektrophotometer gemessen.

Die Testlösungen wurden in folgender Konzentration angesetzt: Trypsin: 1 mg/ml; 185 E/mg, Worthington, Biochemical Corporation;

Pronase: 1 mg/ml; B grade, Calbiochem, 45000 PUK/mg

S_1 : 0,5 mg/ml; S_2: 0,5 mg/ml

ERGEBNISSE

Isolierung und Charakterisierung der wachstums - stimulierenden Serumproteine S_1 und S_2

Die Auftrennung der aus Fötalserum isolierten Säure - sedimentfraktion an Hydroxylapatit ist in Abb. 8a) dargestellt. Eluiert wurde mit einem diskontinuierlichen Salzgradienten (Stufen: 0,005 M, 0,08 M, 0,12 M, 0,16 M, 0,2 M, 0,5 M Na-Phosphatpuffer/pH 6,8). Die wachstumsstimulierende Aktivität war hauptsächlich in den mit 0,12 M und 0,5 M Na-Phosphatpuffer eluierten Fraktionen enthalten. Abb. 8b) zeigt das Elutions - profil dieser beiden an Hydroxylapatit rechromatographierten Fraktionen. Die Hauptproteinmenge wurde wieder bei der entsprechenden Salzstufe eluiert.

Bei der nun folgenden Gelfiltration an Sephadex G-150 wurde die mit 0,12 M Phosphatpuffer beim relativen Elutionsvolumen $V_e / V_o > 2$ eluierte Proteinfraktion mit S_2 bezeichnet. Die mit 0,5 M Phosphatpuffer eluierte Proteinfraktion S_1 war im Ausschlußvolumen V_o enthalten, das mit Dextranblau 2000 bestimmt wurde.

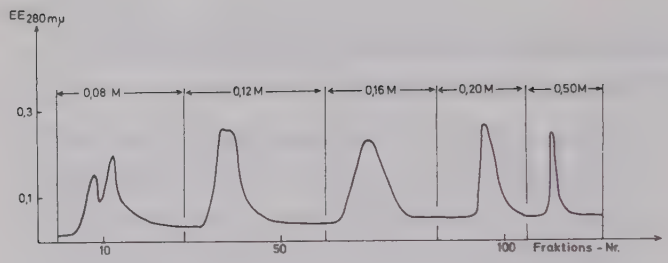


Abb. 8a) Elutionsdiagramm der Säuresedimentfraktion bei der Trennung an Hydroxylapatit.
Eluant: Diskontinuierlicher Salzgradient (0,005 M, 0,08 M, 0,12 M, 0,16 M, 0,2 M, 0,5 M Na-Phosphatpuffer, pH 6,8.)

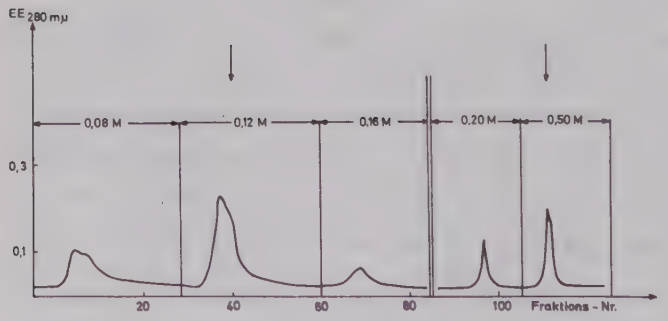


Abb. 8b) Rechromatographie der mit 0,12 M bzw. mit 0,5 M Na-Phosphatpuffer/pH 6,8 eluierten Fraktionen.

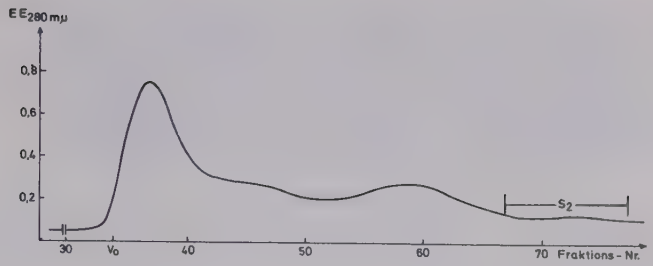


Abb. 9) Elutionsprofil der mit 0,12 M Phosphatpuffer, pH 6,8 , eluierten Proteinfraktion an Sephadex G-150.

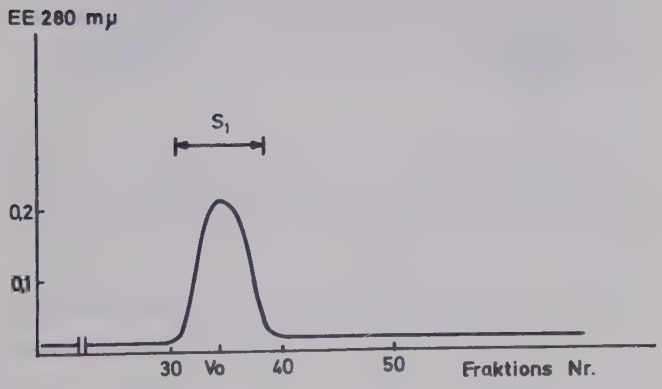


Abb. 10) Elutionsprofil der mit 0,5 M Phosphatpuffer, pH 6,8 , eluierten Proteinfraktion an Sephadex G-150.
Eluant: PBS/pH 7,2 ; Fraktionen à 5 ml.

In Tab. 1) sind die Proteinkonzentrationen im Kulturmedium für maximale Wachstumsstimulation und die Ausbeute an biologischer Aktivität während der Isolierungsprozedur von S_1 und S_2 zusammengefaßt:

	Proteinkonzentration f. maximale Stimulier. (µg N/ml Medium)	% Ausbeute an Aktivität KS = 100 %
0-50 % AS-Sed.	92	80
Säuresed. pH 4,9	34	38
Säuresed. UF	21	38
S_1	0,65	5
S_2	4,3	6

Tab. 1) Isolierung von S_1 und S_2 aus fötalem Kälberserum.

Zur Überprüfung der Proteinfraktionen S_1 und S_2 auf Einheitlichkeit wurden zunächst Elektrophoresen auf Celluloseacetat durchgeführt. Wie aus Abb. 11) und Abb. 12) ersichtlich, sind beide Fraktionen homogen.

Abb. 11) Elektrophorese von S_1 auf Zelluloseacetat.
Elektrophoresebedingungen: 3 mA, 250 V, 30 Min.
Elektrodenpuffer : 0,05 M Na-Phosphat-puffer, pH 7

Abb. 12) Elektrophorese von S_2 auf Zelluloseacetat.
Elektrophoresebedingungen: s. Abb. 11)

Immunelektrophoretisch auf Agarose (Abb. 13 und 14) wurde nur eine Präzipitationsbande hinsichtlich S_1 bzw. S_2 ausgebildet.
Zur Immundiffusion wurden nach der Elektrophorese Antikörper gegen Säuresediment UZ bzw. S_2 in die aus dem Agar gestanzte Rinne gefüllt.

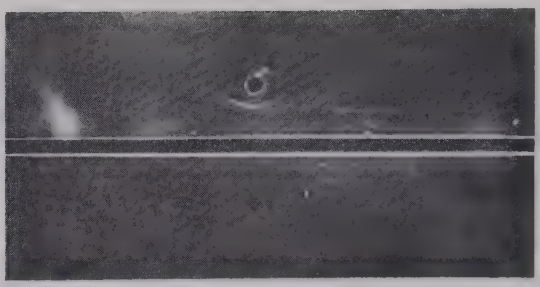


Abb. 13) Immunelektrophorese von Säuresediment UZ und S_1 auf Agarose.

Elektrophoresebedingungen: 5 mA, 300 - 400 V, 2 Stunden, 4°C.

Elektrodenpuffer : 0,05 M Veronalpuffer, pH 8,6.

In das obere Loch wurde Säuresediment UZ, in das untere S_1 gefüllt.

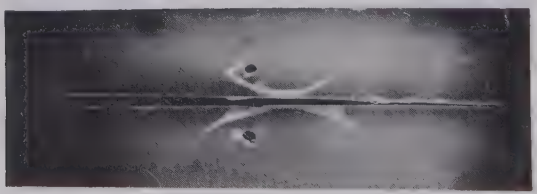


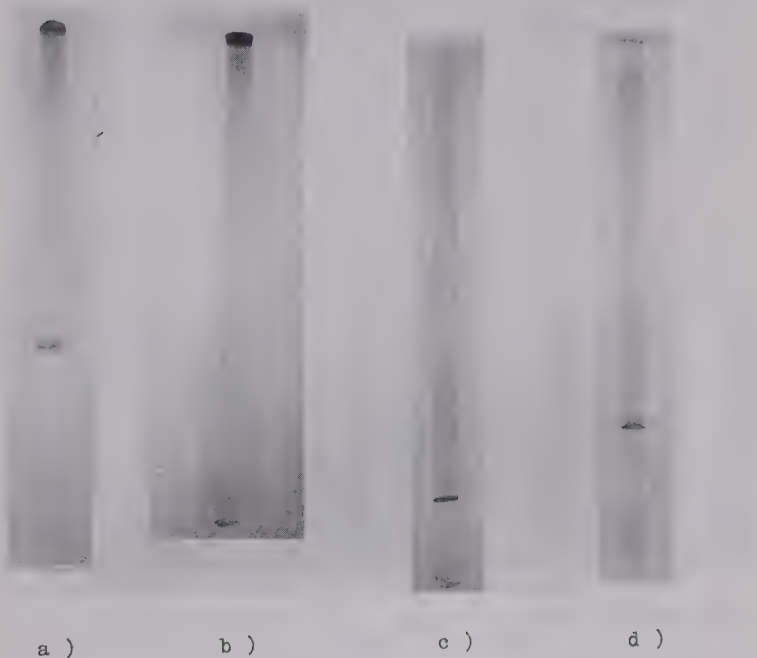
Abb. 14) Immunelektrophorese von S_2 auf Agarose. Elektrophoresebedingungen s. Abb.13)

In das obere und untere Loch wurde S_2 eingefüllt.

Während in der oberen Bildhälfte von Abb. 13) mindestens 5 Banden erkennbar sind, sind S_1 und S_2

immunelektrophoretisch einheitlich.

Auch in der Polyacrylamidgelelektrophorese in 5 , 6 und 7,5 proz. Gelen ließen sich S_1 und S_2 nicht auftrennen. Jedoch spaltete S_1 in 6 M Harnstoffgelen in 2 Banden auf.



a) b) c) d)

Abb. 15) Polyacrylamidgelelektrophorese von S_1 und S_2.

a) S_1,6 proz. Gel, mit Harnstoff
b) S_1,6 proz. Gel,ohne Harnstoff
c) S_2,6 proz. Gel,ohne Harnstoff
d) S_2,7,5 proz. Gel, mit Harnstoff

Elektrophoresebedingungen: 5 mA, 300 V;

Bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) konnte für S_1 ein IEP von 4,5 , für S_2 ein IEP von 4,8 ermittelt werden (Abb. 16).
Die auf Zelluloseacetatfolien in einer Mikrozonenkammer bei verschiedenen Puffersystemen (pH 3-8) durchgeführten Elektrophoresen ergaben für S_1 einen IEP zwischen 5,0 und 4,7 , für S_2 einen IEP zwischen 4,9 und 4,7 .

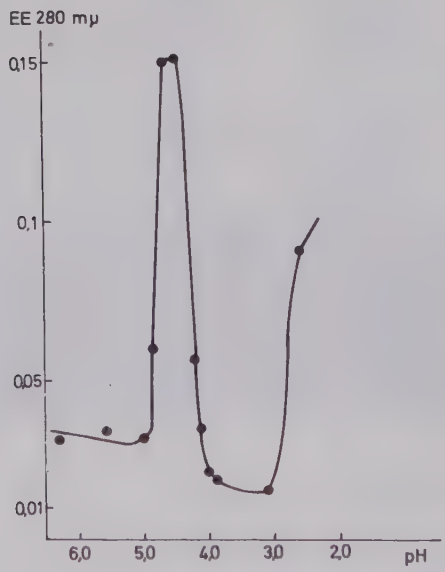


Abb. 16) Isoelektrische Fokussierung (IEF) von S_1.
Elektrophoresebedingungen: pH-Gradient: pH 4-6
1000 V , 1,2 mA;

Aus Lichtstreumessungen mit dem Brice-Phoenix Differential-Refraktometer konnte für S_1 ein mittleres MG von 600000 D errechnet werden.

Aus Sedimentationsläufen in der analytischen Ultra - zentrifuge (Modell E, Spinco Div., Beckman) ergab sich für S_1 in PBS/pH 7,2 eine reversible Aufspaltung in einen Doppelpeak mit S_{20}-Werten von 13 und 3,6 (Abb. 17). Wurde nämlich die Fraktion mit S_{20}-Wert von 13,0 nach Sedimentation auf den Boden von der Fraktion mit S_{20}-Wert von 3,6 abgetrennt und wurden beide Fraktionen unter denselben Bedingungen getrennt zentrifugiert, so erhielt man in beiden Fällen wieder dasselbe 2-gipflige Sedimentationsbild.

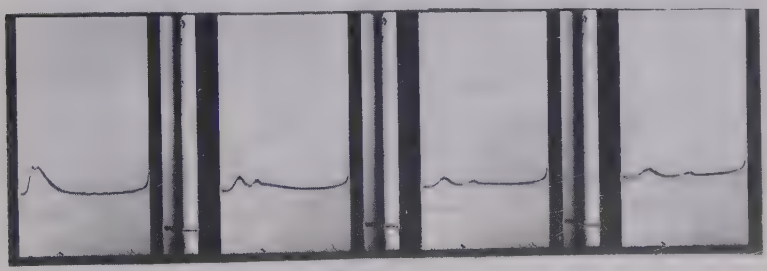


Abb. 17) Sedimentationslauf von S_1 in der analytischen Spinco-Ultrazentrifuge in PBS, pH 7,2 .
Zentrifugationsbedingungen: 59780 UpM, 20°C, 40 Minuten

In 8 M Guanidiniumchloridlösung stellte sich das Molekül einheitlich in einem Gipfel ohne Schulter dar (Abb. 18).

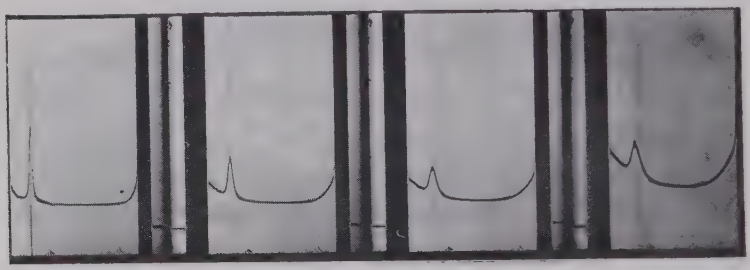


Abb. 18) Sedimentationslauf von S_1 in der analytischen Spinco-Ultrazentrifuge in 8 M Guanidiniumchloridlösung.

Zentrifugationsbedingungen: 59780 UpM, 20°C, 40 Minuten.

Für S_2 wurde aus Diffusionsläufen bzw. Sedimentationsläufen ein MG von 26000 D bzw. ein S_{20}-Wert von 2,4 ermittelt (Abb. 19a und 19b).

Bei der Gelfiltration an Sephadex G-150 erscheint S_1 im Ausschlußvolumen, was bei Molekülen mit Molekulargewichten größer als 400000 D der Fall ist (Abb. 10).

In der Zonenelektrophorese konnte S_1 der α_2-Makroglobulinregion zugeordnet werden.

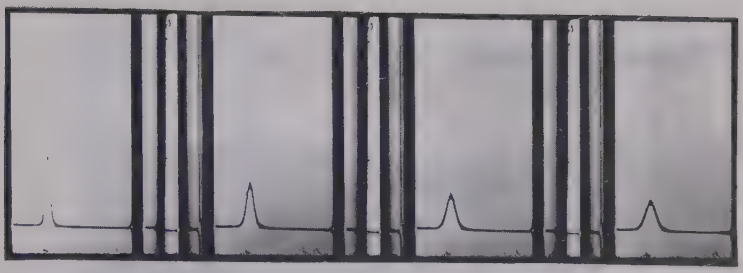


Abb. 19 a) Verhalten von S_2 in der analytischen Spinco-Ultrazentrifuge.

Diffusionslauf:
Zentrifugationsbedingungen: 4600 UpM, 20°C .

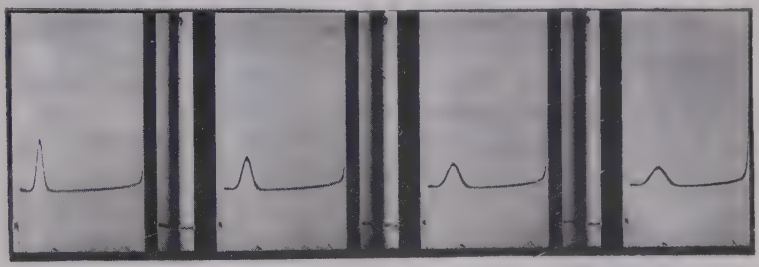


Abb. 19 b) Verhalten von S_2 in der analytischen Spinco-Ultrazentrifuge.

Sedimentationslauf:
Zentrifugationsbedingungen: 59780 UpM, 20°C .

Um auszuschließen, daß es sich bei S_1 um α_2-Makroglobulin-Schultze handelt, welches das Wachstum von embryonalen Mäusezellen stimuliert (64), wurden immun-, diskelektrophoretische und chromatographische Untersuchungen durchgeführt.

So bildet sich bei der Immunelektrophorese nur eine Präzipitationsbande mit α_2- Makroglobulin-Schultze aus (Abb. 20).

Abb. 20) Immunelektrophorese von S_1 und α_2- Makroglobulin-Schultze.

obere Bildhälfte: S_1
untere Bildhälfte: α_2- Makroglobulin-Schultze
Nach 2 stündiger Elektrophorese bei 400 V, 5 mA, wurde zur Immundiffusion Kaninchen-anti α_2- Makroglobulin-Schultze-Serum (Behringwerke AG, Marburg, Lahn, Batch - Nr. 1511) in die Rinne gefüllt.

Einen Vergleich von S_1 mit α_2-Makroglobulin-Schultze in der Diskelektrophorese gibt Abb. 21) wieder. Beide Substanzen zeigen also in der Polyacrylamidgelelektrophorese ein unterschiedliches Verhalten.

Abb. 21) Polyacrylamidgel-elektrophorese in 6 proz. Gel.

links : S_1
rechts: α_2-Makroglobulin-Schultze

Elektrophoresebedingungen:
5 mA/Röhrchen, 2-3 Stunden.

Daß S_1 und α_2-Makroglobulin - Schultze nicht identisch sind, spiegelt auch die Chromatographie an Sepharose 4B wieder.

α_2-Makroglobulin-Schultze war ein Geschenk von Herrn Dr. Heimburger, Behringwerke AG, Marburg.

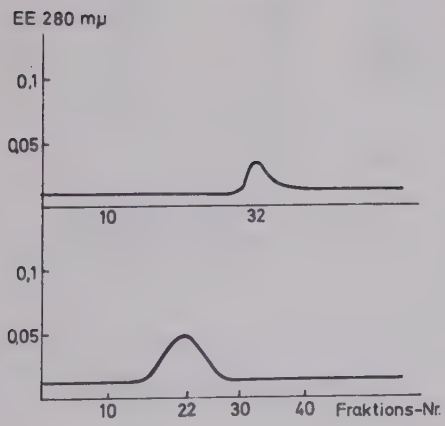


Abb. 22)

Elutionsprofil von S_1 und α_2-Makro - globulin-Schultze bei der Chromatographie an Sepharose 4B .

oben : S_1
unten: α_2-Makro - globulin-Sch.

Pepsinverdauung

Eine 2 Stunden dauernde Inkubation der Säuresediment - fraktion mit Pepsin (1 mg/ml) bei pH 4,0 ließ die wachstumsstimulierende Wirkung drastisch abfallen. (Tab.5). So konnte nur noch eine Aktivität von 4 Prozent, bezogen auf 10 proz. Kälberserum, nach - gewiesen werden.

Temperatursensitivität

Schon nach 1-minütigem Erhitzen ist ein starker Aktivitätsverlust zu verzeichnen (Tab. 2). Offensichtlich nimmt diese Labilität mit fallendem pH-Wert zu.

pH	2	4	7
^{3}H-Thymidineinbau % Stimulierung (10 % KS = 100 %)	10	20	25

Tab. 2) 1 minütiges Erhitzen der Säuresediment - fraktion bei 100°C .

Denaturierung in 6 M Harnstoff- und 6 M Guanidinium - chloridlösung .

Eine 16 stündige Inkubation in 6 M Harnstoff- und

8 M Guanidiniumchloridlösung brachte eine Aktivitäts - minderung von 55 - 60 Prozent (10 % KS =100 %, Tab. 5).

UV - Absorptionsspektrum von S_1 und S_2

Proteine zeichnen sich durch ein deutliches Absorptionsmaximum bei 280 mu infolge ihres Tyrosin- und Tryptophangehaltes aus.
In Abb. 23) ist das UV - Absorptionsspektrum von S_1 und S_2 dargestellt.

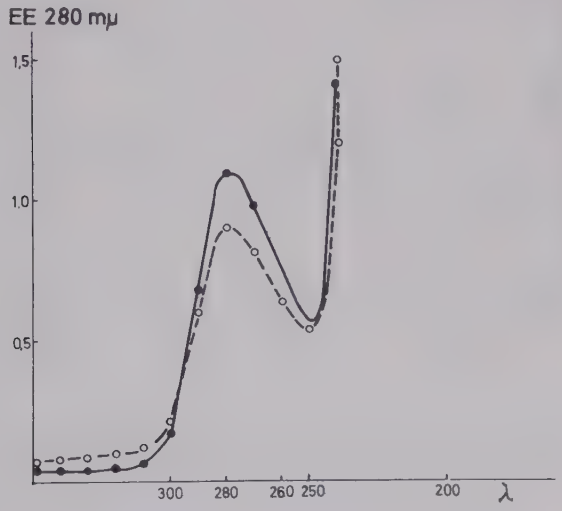


Abb. 23) UV - Absorptionsspektrum von S_1 und S_2 im Wellenlängenbereich von 350 - 240 mμ .
o-o-o S_1 ●-●-● S_2

Stimulierung der DNA - Synthese von embryonalen Rattenfibroblasten

Wie aus Abb. 24) ersichtlich ist, besitzt S_1 eine um ca. 40 Prozent höhere wachstumsstimulierende Wirkung als S_2, wenn beide Proteine in optimalen Dosen zum Kulturmedium pipettiert werden. Bei Kombination von S_1 mit S_2 wird nahezu die stimulierende Aktivität von 1o proz. Serum erreicht.

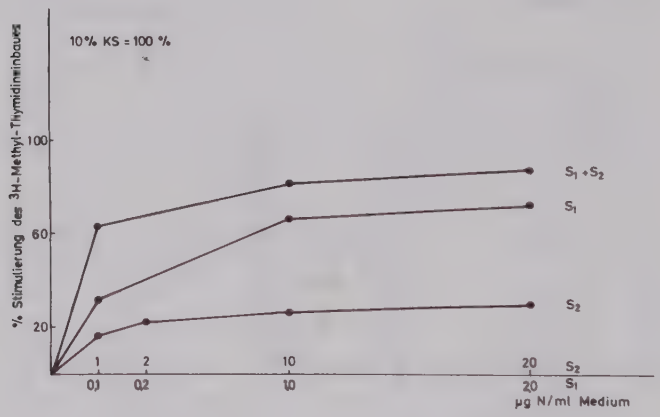


Abb. 24) Stimulierung des ^{3}H-Thymidineinbaues in Rattenfibroblasten durch S_1 und S_2 .

Embryonale Rattenfibroblasten, die 24 Stunden in Medium ohne Serum gehalten worden waren, wurden für 21 Stunden in Medium mit den entsprechenden Substanzen inkubiert und danach mit ^{3}H-Thymidin (0,25 µCi/ ml Medium) für

60 Minuten markiert. Der Einbau in Gegenwart von 10 Prozent KS im gleichen Ansatz ist 100 Prozent gesetzt. Unter 0 Prozent Stimulierung ist ein ^{3}H-Thymidineinbau zu verstehen, wie er in serumfreiem Medium ohne weiteren Zusatz zu finden ist.
●-●-● S_1 + S_2 (2 µg)

S_1 als Trägerprotein für Insulin

Während die Insulinbindung von α_2-Makroglobulin-Schultze umstritten ist (65,66,67) konnte Insulin in der S_1 - Proteinfraktion radioimmunologisch nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden. Die sehr sensitive, radioimmunologische Insulinbestimmung nach Hales und Randle (51) ergab 3,1 x 10^{-3} Mol gebundenes Insulin/Mol S_1; dies entspricht 13,1 µ IE Insulin/mg S_1 (Mittel 3 Einzelbestimmungen). Der Insulinplasmaspiegel beträgt 10^{3} µ IE Insulin/ml Plasma.
Die Insulinbestimmung wurde wie bei Erstellung der Insulinstandardkurve (Methoden) durchgeführt.

Mit Hilfe der Ultrazentrifuge war jedoch selbst bei 72 stündigen Inkubationszeiten keine Bindung von ^{125}Jod-Insulin an α_2-Makroglobulin-Schultze und S_1 festzustellen (Abb. 25). Die Schulter des ^{125}Jod-Insulinpeaks zwischen Fraktionsnummer 16-23 dürfte auf die über einen weiten pH-Bereich stattfindende Aggregatbildung von Insulin zurückzuführen sein (68).

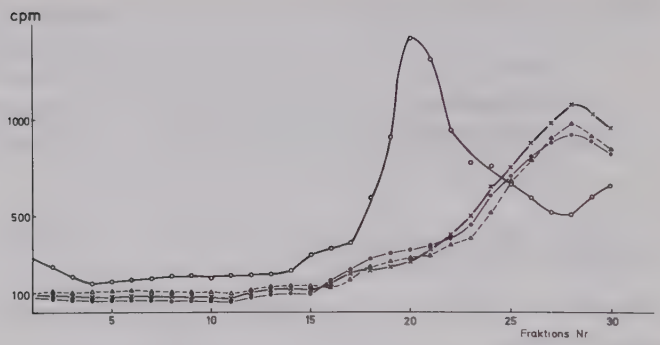


Abb. 25) Ultrazentrifugation im 5-20 proz. Saccharosegradienten.

α_2-Makroglobulin-Schultze und S_1 wurden 72 Stunden bei 37°C mit ^{125}Jod-Insulin (spez. Aktivität: 50 µCi/µg) inkubiert und auf den 5-20 proz. Saccharosegradienten aufgetragen.

o-o-o ^{125}Jod-S_1
●-●-● ^{125}Jod-Insulin
x-x-x ^{125}Jod-Insulin + S_1
Δ-Δ-Δ ^{125}Jod-Insulin + α_2-Makroglobulin-Sch.

Insulinbindung an S_1

Je 1 ml S_1-Fraktionen (0,95 mg/ml) wurden mit den Insulindosen 0,1 µg, 1 µg, 0,01 mg, 0,1 mg, 1 mg 48 Stunden bei 4°C inkubiert und nicht gebundenes Insulin über Sephadex G-150 abgetrennt. Die inkubierten S_1-Eluatfraktionen wurden lyophilisiert und auf

1 ml Volumen gebracht. Die an S_1 gebundenen Insulinmengen wurden radioimmunologisch bestimmt und die Werte gegen die freie Insulindosis aufgetragen (Abb. 26).

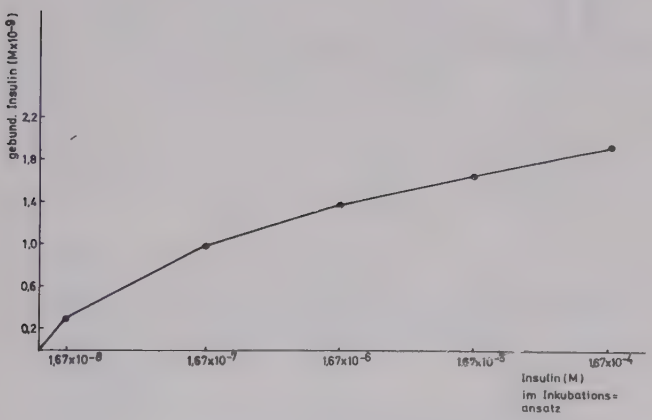


Abb. 26) Insulinbindung an S_1

Wie Abb. 27) zeigt, steht das Verhältnis gebundenes/freies Insulin zur Konzentration an gebundenem Insulin in linearer Beziehung, Voraussetzung für eine Insulinbindung an nur einen Rezeptortyp.

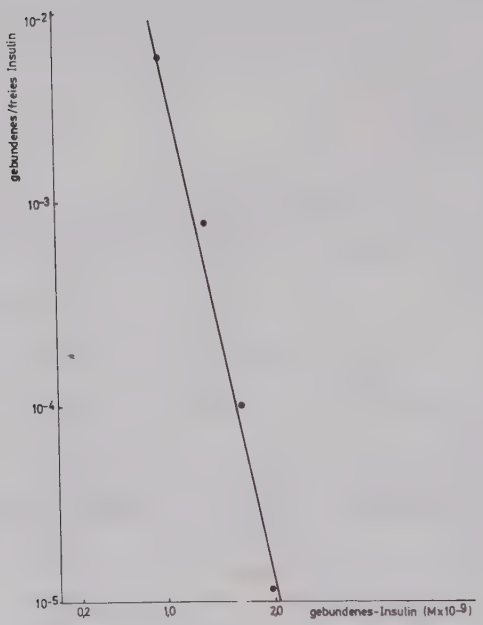


Abb. 27) Scatchard Analyse der Insulinbindung an S_1

Stimulierung der DNA-Synthese von embryonalen Rattenfibroblasten mit S_1 und in Kombination mit Insulin.

Bei optimalen Dosen von S_1 lassen sich im Mittel 60 Prozent der Zellen (10 % KS = 100 %) aktivieren (Tab.5). Bei Zugabe von Insulin (1o µg/ml Medium)

kann ein zusätzlicher, additiver Effekt erzielt werden (Abb. 28).
Auch Clarke (10) konnte bei BHK 21 Fibroblasten die wachstumsstimulierende Wirkung von Serum durch Insulin erhöhen; hier war jedoch das Proteohormon allein völlig inaktiv.
Temin (69) konnte bei Enten-und Hühnerzellen sogar Serum durch Insulin ersetzen.

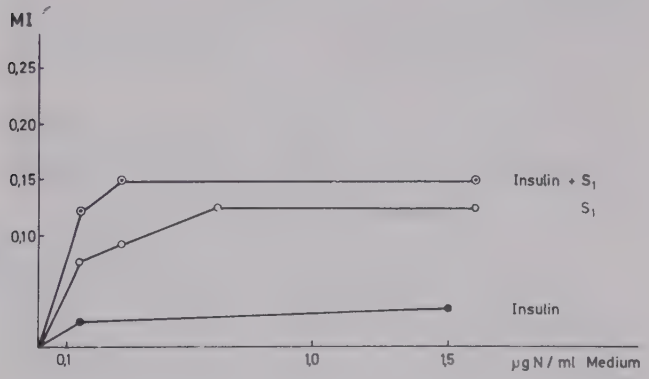


Abb. 28) ^{3}H-Thymidineinbau in Rattenfibroblasten

Rattenfibroblasten wurden 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert; anschließend wurden Insulin ●-●-● , S_1 o-o-o und Insulin (10 µg/ml Medium) + S_1 ◎-◎-◎ in den entsprechenden Konzentrationen zupipettiert. 21 Stunden später wurden die Zellen für

60 Minuten mit ^{3}H-Thymidin (0,25 µCi/ml Medium) markiert und die Markierungsindices bestimmt. (Jeder Meßwert ist das Mittel 2 Einzelbestimmungen).

Um die wachstumsstimulierende Wirkung von S_1 allein, d.h. ohne adsorptiv gebundenes Insulin, untersuchen zu können, wurde dieses Protein mit steigenden Mengen Schweine-anti Insulin-Serum inkubiert und die Antikörper über Sephadex G-150 abgetrennt. Wie aus Tab. 5) ersichtlich, fällt die Aktivität nicht unter 50 Prozent (10 % KS = 100 %) ab.

Es stellt sich nun die Frage, ob zur Initiierung der DNA-Synthese Insulin erforderlich ist oder S_1 allein die Zellen in die S-Phase zu triggern vermag.

Zur Lösung dieses Problems wurden die Zellen 24 Stunden in Medium ohne Serum inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 wurde dann Insulin, 7 bzw. 12 Stunden danach S_1 ins Kulturmedium pipettiert. Die Kontrolle erhielt kein Insulin (S_1: t: 0 h). 15 Stunden nach Versuchsbeginn wurde die DNA-Synthese zeitkinetisch über 12 Stunden verfolgt. Wie Abb.29) zeigt, werden die DNA-Synthese Anstiege um 7 bzw. 12 Stunden versetzt vorgefunden.

Wird umgekehrt zum Zeitpunkt 0 zuerst S_1 und 5 Stunden danach Insulin zum Kulturmedium gegeben, so wird das Maximum des Thymidineinbaues nach 21 Stunden, wie bei Zellen, die zum Zeitpunkt 0 S_1 und Insulin erhielten, erreicht (Abb. 30). Dies beweist , daß Insulin

kein Regulator der Initiierung der DNA-Synthese bei embryonalen Rattenfibroblasten sein kann. Es wirkt jedoch in dem zeitkinetisch erfaßten Bereich schon nach kurzer lag-Phase (Abb. 31) etwas stimulierend auf den ^{3}H-Thymidineinbau.

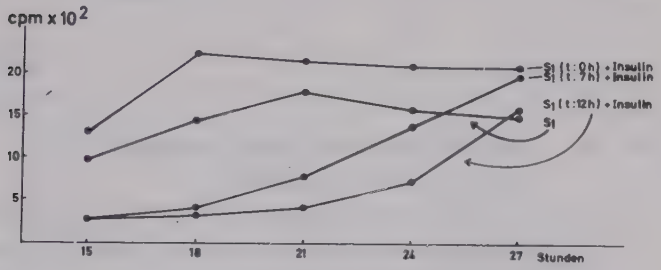


Abb. 29) ^{3}H-Thymidineinbau in die säureunlösliche Fraktion von Rattenzellen.

Die Rattenzellen wurden für 24 Stunden in Medium ohne Serum vorinkubiert. Die Insulinzugabe erfolgte zur Zeit t: 0 h (Io µg/ml). S_1 wurde zur Zeit t: 0 h, 7 h, 12 h ins Kulturmedium pipettiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen für 60 Minuten mit ^{3}H-Methylthymidin (0,25 µCi/ml Medium, spez. Aktivität: 5 Ci/mMol) pulsmarkiert.

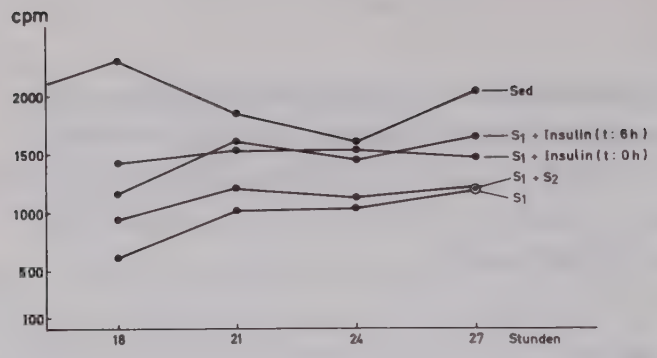


Abb. 30) ^{3}H-Thymidineinbau in die säureunlösliche Fraktion von Rattenzellen.

Die Rattenzellen wurden für 24 Stunden in Medium ohne Serum vorinkubiert. Die Insulinzugabe (10 µg/ml Medium) erfolgte zur Zeit t: 0 h, t: 6 h. Die wachstumsstimulierenden Proteinfraktionen wurden in optimalen Dosen (Tab. 1) zur Zeit t: 0 h ins Kulturmedium gegeben. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen für 60 Minuten mit ^{3}H-Methylthymidin (0,25 µCi/ml Medium) pulsmarkiert.

Eine Aktivitätssteigerung von Insulin aber könnte vielleicht über die Ausbildung einer günstigen Molekül - struktur eintreten.

So wäre es denkbar, daß eine Bindung an einen Träger die wachstumsstimulierende Wirkung des Peptidhormons

erhöhen könnte. Die Kupplung von Insulin an Sepharose 4B wie auch die Vernetzung von Insulin mit Glutaraldehyd zu löslichen Aggregaten mit mittlerem Molekulargewicht von 280000 D hatten jedoch keine zusätzliche Stimulierung des ^{3}H-Thymidineinbaues in die säureunlösliche Fraktion zur Folge (Tab.5).

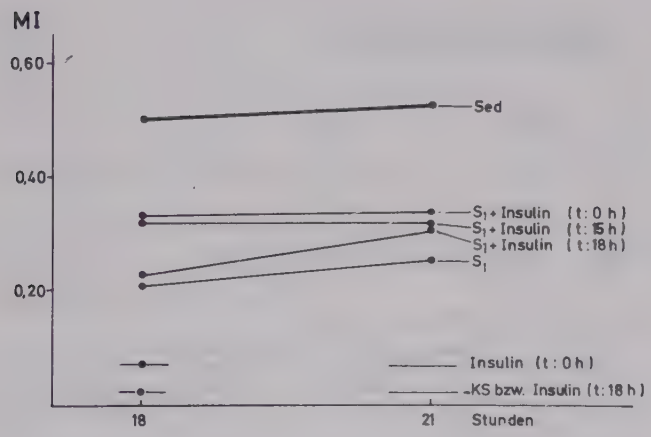


Abb. 31) ^{3}H-Thymidineinbau in die säureunlösliche Fraktion von Rattenzellen.

Die Rattenzellen wurden für 24 Stunden in Medium ohne Serum vorinkubiert. Die Insulinzugabe (10 µg/ml Medium) erfolgte zur Zeit t: 0 h, 15 h, 18 h. Die wachstumsstimulierenden Proteinfraktionen wurden in optimalen Dosen (Tab. 1) zur Zeit t: 0 h ins Kulturmedium

pipettiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen für 60 Minuten mit ^{3}H-Methyl-thymidin (0,25 µCi/ml Medium) markiert und die Markierungsindices bestimmt.

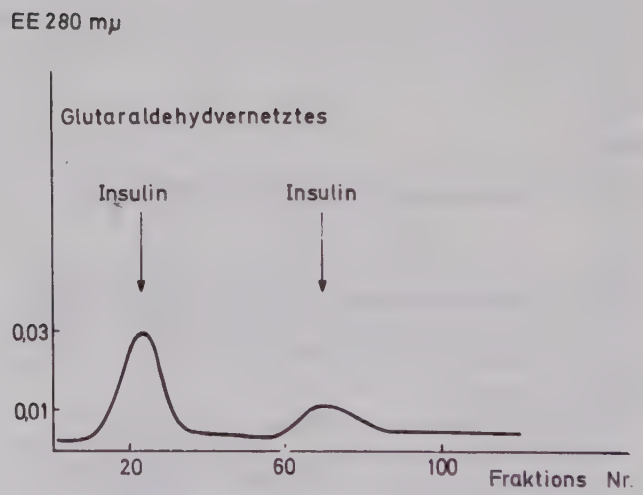


Abb. 32) Chromatographie von glutaraldehydbehandeltem Insulin an Sephadex G-100.

Trennbedingungen: Eluant: PBS/pH 7,2
Sephadex G-100 (Pharmacia, Uppsala) wurde 7 Stunden bei 80°C gequollen, im Exsiccator entlüftet und gegen PBS/pH 7,2 äquilibriert.

Da das Wachstum vieler Gewebe von STH, das glykotrope, pankreotrope, diabetogene und lipotrope Eigenschaften besitzt, beeinflußt wird, drängt sich die Frage auf, ob nicht vielleicht der wachstumsstimulierende Effekt von S_1 und S_2 auf embryonale Rattenfibroblasten über adsorptiv gebundenes STH erfolgen könnte.
Eine Bindung von STH an Plasmaproteine wurde von Hadden et al. (70) und Collipp et al. (71) diskutiert. So soll nach diesen Autoren STH an α_2-Makroglobulin - Schultze und an Serumalbumin gebunden sein.
Berson et al. (72) und Adham et al. (73) schlossen dagegen eine signifikante Bindung an höhermolekulare Serumkomponenten aus.
Wie aus Abb. 33) hervorgeht, enthält weder S_1 noch S_2 adsorptiv gebundenes STH.

Während STH die Zellproliferation bei Chondrozyten (74) stimuliert, konnte bei embryonalen Rattenzellen keine wachstumsstimulierende Wirkung festgestellt werden (Tab. 5). Kein wachstumsstimulierender Effekt war auch bei Humanfibroblasten und 3T3 Zellen nachweis - bar (75,76).

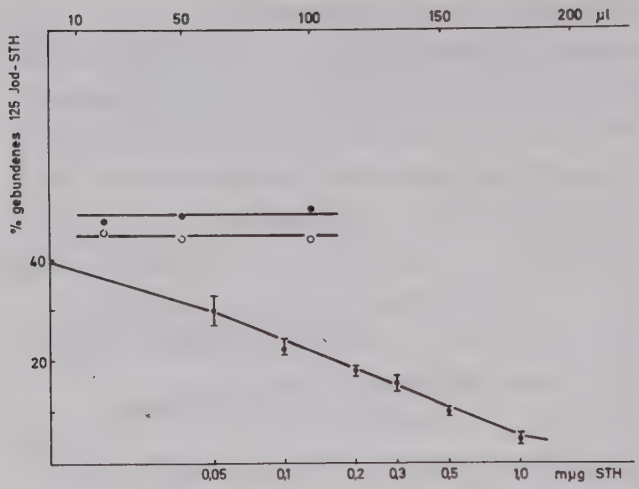


Abb. 33) Radioimmunologische STH-Bestimmung

Meßbereich: 0,05 - 1,0 mµg STH
Basalwert im Serum (Mittel: 1,6 mµg/ml)
o-o-o S_1 ●-●-● S_2

Effekte der wachstumsstimulierenden Serumproteine S_1- und S_2 auf intakte epididymale Fettzellen und Fettzell-ghosts.

Pierson und Temin (77) berichteten von einer partiellen Reinigung eines Proteins aus Kälberserum, welches die Zellteilung von Hühnerfibroblasten stimuliert und NSILA-S Aktivität (78,74) bei epididymalen Fettzellen ausübt. NSILA-S, ein Polypeptid aus Serum, stimuliert

die Glukoseoxidation, reduziert die Basalaktivität der Adenylatzyklase in Fettzellghosts und hemmt die lipolytischen Hormone Noradrenalin, Glukagon und ACTH.
Um nun die in dieser Arbeit beschriebenen Serumproteine S_1 und S_2 mit der Temin'schen Proteinfraktion vergleichen zu können, wurde die Wirkung auf die Glukoseoxidation von intakten Fettzellen und auf die Adenylatzyklase in Fettzellghosts untersucht.
Abb. 34) zeigt die Dosis - Wirkungsbeziehung von S_2 und Insulin bei der Freisetzung von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Glukose.

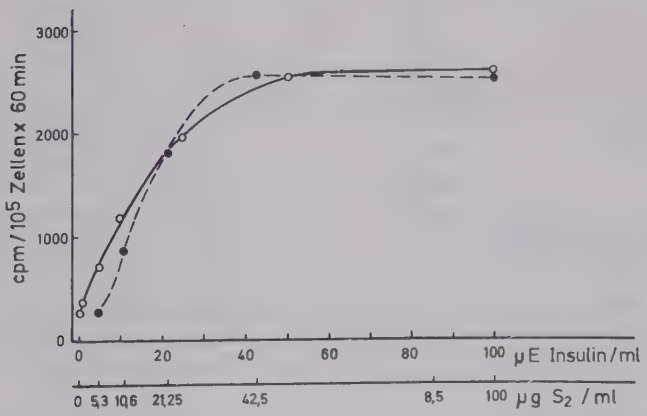


Abb. 34) Dosis - Wirkungsbeziehung von S_2 und Insulin. Stimulierung der 1-^{14}C-Glukoseoxidation in isolierten Fettzellen.

Beide Verbindungen stimulieren die Glukoseoxidation zum selben Maß; für maximale Antwort muß Insulin in einer Konzentration von 5×10^{-10} M, S_2 in einer Konzentration von wenigstens 2×10^{-6} M zum Inkubationsansatz pipettiert werden.
Der Insulineffekt wird völlig aufgehoben durch Schweine-anti Insulin-Serum, jedoch überhaupt nicht der S_2-Effekt.

Substrat	Schweine-anti Insulin-Serum	$^{14}CO_2$-Produktion cpm/10^5 Zellen
-	-	321 ± 15
	+	226 ± 9
Insulin (100 µE/ml)	-	2634 ± 55
	+	209 ± 10
S_1 (2,5 µg/ml)	-	400 ± 28
	+	203 ± 19
S_2 (4,2 µg/ml)	-	2663 ± 67
	+	2539 ± 48

Tab. 3) Stimulierung der 1-^{14}C-Glukoseoxidation in isolierten Fettzellen mit und ohne zugefügte Insulinantikörper.
(Daten sind Mittelwerte 3 Einzelmessungen ± SA)

Die Ergebnisse demonstrieren deutlich, daß die Wirkung von S_2 auf epididymale Fettzellen nicht durch Insulin vermittelt wird. Die stimulierende Wirkung von S_1 dagegen konnte Insulin zugeordnet werden, das mit S_1, wie oben beschrieben, einen Komplex bildet. Dies geht aus der völligen Hemmung der Stimulierung der Glukoseoxidation in Gegenwart von Insulinantikörpern hervor.
In Tabelle 4) ist die Wirkung von S_2 auf die Adenylatzyklase von Fettzellghosts dargestellt.

Substrat	3',5'-cAMP gebildet (nMol/g Protein x Min.)
-	107 ± 4,0
S_1 (2,5 µg/ml)	111 ± 3,8
S_2 (4,2 µg/ml)	176 ± 24
Noradrenalin (10^{-6} M)	265 ± 31

Tab. 4) Effekte von S_1 , S_2 und Noradrenalin auf die Adenylatzyklase in Fettzellghosts. (Jeder Wert ist das Mittel 3 Einzelmessungen ± SA)

Die Adenylatzyklase dieser "Ghosts" wird durch Adrenalin (79) und Noradrenalin (59) aktiviert, die Wirkung dieser lipolytischen Hormone jedoch durch Insulin und NSILA-S antagonisiert.
Während S_2 also die Adenylatzyklase aktiviert, erfolgt

mit S_1 keine Stimulierung der Adenylatzyklase über ihre Basalaktivität. Wie aus Abb. 35) ersichtlich ist, kann nach Stimulierung der Adenylatzyklase in Fettzellghosts mit Noradrenalin die maximale Antwort durch S_2 noch weiter erhöht werden (80).

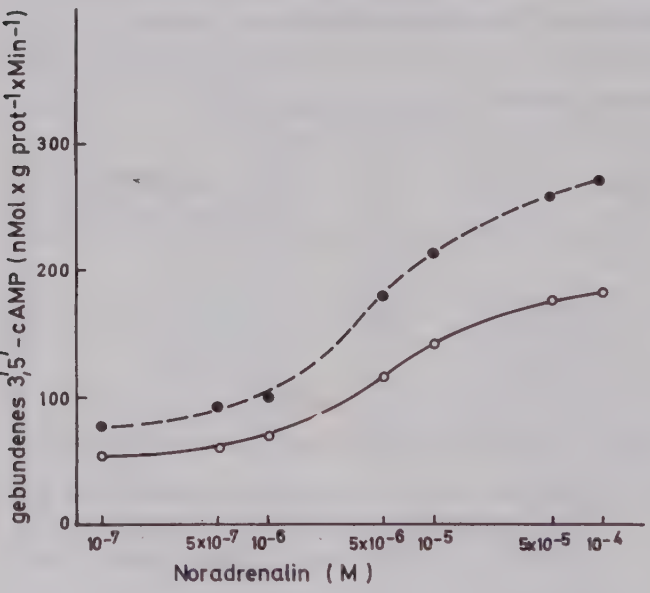


Abb. 35) Erhöhung der Noradrenalinwirkung auf die Adenylatzyklase durch S_2.
o-o-o Noradrenalin
●-●-● Noradrenalin + S_2 (4,2 µg/ml)

Untersuchung auf esterolytische und proteolytische Aktivität von S_1 und S_2.

Die Enzymbindungsfähigkeit von α_2 - Makroglobulin-Schultze ist seit mehreren Jahren bekannt.
So berichteten Nagasawa et al. (81,82), Barrett et al. (83) und Dürr et al. (66) über die Bindung von Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin, Plasmin, Elastase, Kallikrein, Papain und Aspartat-Aminotransferase an dieses Serumprotein. Obwohl diese Enzyme ihre proteolytische Aktivität bei der Bindung verlieren, bleibt ihre esterolytische Aktivität erhalten.

Die Möglichkeit einer Enzymbindung von S_1 und S_2 konnte, wie aus Abb. 36) und Abb. 37) ersichtlich ist, ausgeschlossen werden.

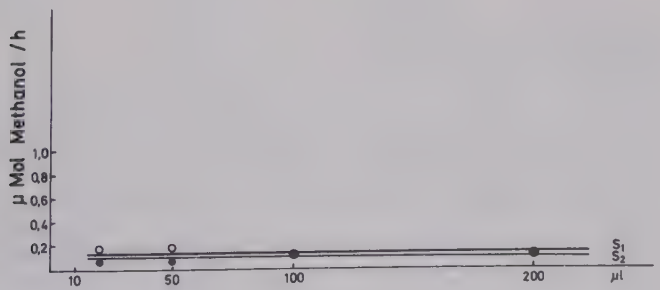


Abb. 36) Untersuchung auf esterolytische Aktivität von S_1 und S_2 .
o-o-o S_1 ●-●-● S_2 (0,5 mg/ml)

Beide Serumproteine sind esterolytisch und proteolytisch inaktiv. Sie zeigen jedoch proteolyseinhibitorische Aktivität.

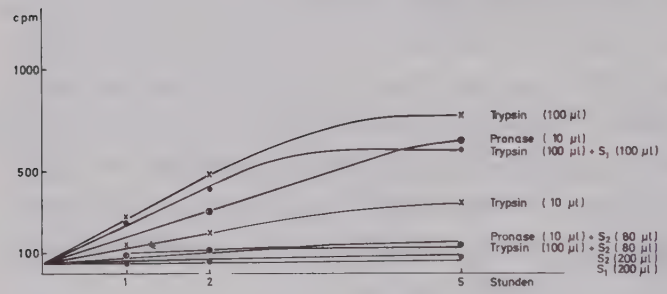


Abb. 37) Proteolyseinhibitorischer Effekt von S_1 und S_2. (c: 0,5 mg/ml)

Spezifität von S_1 und S_2

NSILA-S (74,78,84),das in seiner biologischen Wirkung Insulin ähnelt und dessen Aktivität nicht durch Insulinantikörper (IAK) neutralisiert wird, stimuliert embryonale Rattenfibroblasten zu 53 Prozent (Tab.5), bezogen auf 10 proz. Kälberserum; allerdings ist die Molarität im Vergleich zu S_1 um den Faktor 10^2 größer. Zusammen mit S_1 erreicht es in einer Konzentration von

10^{-7} M die wachstumsstimulierende Wirkung von 10 proz. Kälberserum.

In der Gruppe der Prostaglandine (A_1, E_1, E_2, $F_{1\alpha}$, $F_{2\alpha}$, synthetisiert, Ajinomoto, Co., Inc., Tokyo, Japan), die die lipolytische Wirkung von Catecholaminen, ACTH, Glukagon und Vasopressin hemmen, wurden nur geringfügig aktive Verbindungen gefunden (85,86,87,88). Durch Prostaglandin E_2 und $F_{2\alpha}$ in Kombination mit Insulin lassen sich die Zellen etwas stimulieren, jedoch liegt die wirksame Konzentration von etwa 10^{-6} M weit über der physiologischen (Tab. 6).

Substanz	Konzentration (µg Protein/ ml Medium)	(M)	Prozent Stimulierung des ^{3}H-Thymidineinbaues (10 % KS = 100 %)
Insulin	1	$1,6x10^{-7}$	10,5
	10	$1,6x10^{-6}$	17,5
	100	$1,6x10^{-5}$	17,5
Glutaraldehyd-vernetztes Insulin	0,73	-	3,9
	7,3	-	3,7
	73	-	5,5
Insulin an Sepharose 4B gekuppelt	1,2	-	6,4
	12	-	15,7
α_2-Makroglobulin-Schultze (64)	10	$1,2x10^{-8}$	3,6
	20	$2,4x10^{-8}$	3,6
	50	$6,0x10^{-8}$	6,5
	100	$1,2x10^{-7}$	6,7

Substanz	Konzentration (µg Protein/ ml Medium)	(M)	Prozent Stimulierung des ^{3}H-Thymidineinbaues (10 % KS = 100 %)
α_2-Makroglobulin-Schultze + Insulin (10 µg/ml Medium)	20 50	$2,4x10^{-8}$ $6,0x10^{-8}$	17,5 18,5
S_1	6,4	$1,0x10^{-8}$	60
S_1 + Insulin (10 µg/ml Medium)	6,4	$1,0x10^{-8}$	82,5
S_1 + IAK 0,4 ml / 0,2 ml / 0,5 ml	6,4	$1,0x10^{-8}$	54 50 51
Säuresediment	21	-	100
Säuresediment nach Pepsinverdauung	21	-	4
Säuresediment n. GuCl-Behandlung	21	-	40
Säuresediment n. Harnstoffbehdlg.	21	-	45
Dinitrofluorbenzol-S_1	6,4	-	2,0
^{125}Jod-S_1	6,4	-	58
S_2	15	$0,6x10^{-6}$	30

Substanz	Konzentration (µg Protein/ ml Medium)	(M)	Prozent Stimulierung des ^{3}H-Thymidineinbaues (10 % KS = 100 %)
NSILA-S	1,0	$1x10^{-7}$	3
	10,0	$1x10^{-6}$	27
	20,0	$2x10^{-6}$	53
NSILA-S + S_1 (6,4 µg/ml Med.)	1,0	$1x10^{-7}$	97
	10,0	$1x10^{-6}$	127
Rinderserum - albumin	20,0	$3x10^{-7}$	2
	50,0	$7x10^{-7}$	2,7
Somatotropes Hormon	$0,5x10^{-3}$		-
Adrenalin (89)		$1x10^{-7}$	-
		$1x10^{-6}$	-
		$1x10^{-5}$	-

Tab. 5) ^{3}H-Thymidineinbau in die säureunlösliche Fraktion von embryonalen Rattenfibroblasten.
Die Rattenzellen wurden 24 Stunden in serumfreiem Medium gehalten. Anschließend wurden sie für 21 Stunden in Medium mit den entsprechenden Substanzen inkubiert und mit ^{3}H-Thymidin (0,25 µCi/ ml Medium) für 60 Minuten markiert. Der Einbau in Gegenwart von 10 proz. Kälberserum im gleichen Ansatz ist 100 Prozent gesetzt. Unter 0 Prozent Stimulierung ist ein ^{3}H-Thymidineinbau zu verstehen, wie er in serumfreiem Medium ohne weiteren Zusatz zu finden ist.

Substanz	Konzentration (M) $5,7x10^{-8}$	$5,7x10^{-7}$	$5,7x10^{-6}$	$5,7x10^{-5}$
Prostagld.A_1	6	4	3	2
+ Insulin	8	8	-	-
Prostagld.E_1	8	5	11	2
+ Insulin	8	12	-	-
Prostagld.E_2	5	10	19	2
+ Insulin	12	17	-	-
Prostagld.$F_{1\alpha}$	7	13	13	10
+ Insulin	13	18	-	-
Prostagld.$F_{2\alpha}$	7	10	17	23
+ Insulin	13	22	-	-

Tab. 6) ^{3}H-Thymidineinbau in die säureunlösliche Fraktion von embryonalen Rattenfibroblasten unter dem Einfluß von synthetischen Prostaglandinen (9).
(Versuchsbedingungen s. Tab. 5).

DISKUSSION

Zwei Proteine aus fötalem Kälberserum mit MG 600000 D und 26000 D stimulieren offensichtlich das Wachstum von embryonalen Rattenzellen. Sie sind hitzelabil und verlieren 60 Prozent ihrer wachstumsstimulierenden Aktivität bei Behandlung mit 6 M Harnstofflösung und 8 M Guanidiniumchloridlösung. Somit kann keine Identität mit dem von Lipton und Paul (76,90) beschriebenen pepsinlabilen, das Wachstum von 3T3 Zellen stimulierenden Faktor bestehen, der zwar auch temperatursensitiv ist, aber in Harnstoff- und Guanidiniumchloridlösung keinen Aktivitätsverlust erleidet. Von der Arbeitsgruppe Morley und Kingdon (91) konnte 24 Stunden nach partieller Hepatektomie ein leberspezifischer Faktor aus Rattenserum angereichert werden, der hitzestabil ist, die DNA-Synthese steigert und ein MG von 26000 D hat.

S_1 spaltet in 8 M Guanidiniumchloridlösung bei Gleichgewichtsläufen in der analytischen Ultrazentrifuge reversibel in Untereinheiten mit MG von 60000 D auf. Das Protein zeigt in der Immunelektrophorese eine Präzipitationsbande und ist zonenelektrophoretisch ein α_2-Makroglobulin, aber nicht mit α_2-Makroglobulin-Schultze identisch, dessen wachstumsstimulierende Wirkung nach Healy und Parker (64) wahrscheinlich auf eine Verunreinigung

durch ein α_1-Globulin zurückzuführen ist.
Quantitative Insulinbestimmungen mit der radioimmunologischen Methode ergaben 3,1 x 10^{-3} Mol gebundenes Insulin / Mol S_1 . Je nach Präparation wurde jedoch ein bis um den Faktor 10 unterschiedlicher Insulingehalt festgestellt. Die Möglichkeit einer zusätzlichen Aktivierung durch Bindung an einen Träger (Sepharose 4B) konnte ausgeschlossen werden. Die Aktivität von S_1 fällt nach Präzipitation der Insulinmoleküle des S_1-Insulinkomplexes mit Schweine-anti Insulin-Serum nur auf 50 Prozent ab.
S_2 spaltet diskelektrophoretisch in 6 M Harnstofflösung nicht in Untereinheiten auf und bindet kein Insulin (8,80). Es stimuliert im Vergleich zu S_1 nicht im gleichen Maß die DNA-Synthese, in Kombination mit S_1 erreicht es aber fast die wachstumsstimulierende Wirkung von 10 proz. Kälberserum.Die einfachste Erklärungsmöglichkeit hierfür ist, daß die Zellkulturen sich aus 2 verschiedenen Zelltypen zusammensetzen, von denen der eine durch S_1, der andere durch S_2 aktiviert wird.
S_1 und S_2 sind keine Trägerproteine für somatotropes Hormon, das nach Hadden (70) und Collipp (71) an α_2-Makroglobulin-Schultze und Serumalbumin gebunden sein soll. Somatotropes Hormon stimuliert die DNA-Synthese von Rattenfibroblasten nicht und zeigt auch bei 3T3 Zellen und Humanfibroblasten (75,76) keinen

wachstumsstimulierenden Effekt.

Insulin und insulinähnliche Substanzen beeinflussen zelluläre Funktionen von isolierten epididymalen Fettzellen der Ratte. Sie stimulieren einerseits die Glukoseoxidation, hemmen andererseits die Adenylatzyklase und die lipolytische Aktivität von Noradrenalin und anderen lipolytischen Hormonen in Membranpräparationen von Fettzellen.

Die stimulierende Wirkung von S_1 auf die Glukoseoxidation wird allein durch Insulin vermittelt, da nach Zugabe von Insulinantikörpern der Effekt von S_1 auf die Glukoseoxidation völlig aufgehoben wird. Die Wirkung von S_2 auf die Glukoseoxidation wird in Gegenwart von Insulinantikörpern dagegen überhaupt nicht beeinträchtigt.

Paradox ist, daß S_2 trotz seines Effektes auf die Glukoseoxidation und Lipolyse eine stimulierende Wirkung im Adenylatzyklasesystem zeigt und die Wirkung von Noradrenalin erhöht. Andere Schritte in der Regulation der Lipolyse wie cAMP-Phosphodiesterase und Proteinkinasen müssen näher untersucht werden, um diese Diskrepanz zu erklären.

S_2 und NSILA-S sind nicht identisch. So ist NSILA-S hitzestabil (80°C) und hat ein MG von ca. 10000 D. Bezüglich der Glukoseoxidation und Antilipolyse zeigt S_2 aber NSILA -S Aktivität.

Die Stimulierung der DNA-Synthese bei normalen embryonalen Rattenzellen dürfte wahrscheinlich durch die Ver-

änderung bestimmter Eigenschaften der Oberflächen - strukturen der Membranen eingeleitet werden.
Schon innerhalb 1 Minute erniedrigen S_1 und S_2, nicht jedoch Insulin, die Potentialdifferenz von Zellen, die längere Zeit in Medium ohne Serum inkubiert worden wa - ren, von ca. 50 mV auf 17 mV (Zellinneres negativ, 92). Bereits wenige Minuten nach Zugabe der aktiven Serum- komponenten kann man Veränderungen bei den Phospholipiden der Membranen nachweisen: der Einbau von ^{3}H-Inosit in Phosphatidylinosit wird um das Doppelte, der von ^{32}P - Orthophosphat in dieses Lipid um den Faktor 15 gestei - gert (93).
Diese Befunde legen den Gedanken nahe, daß die Wachstums- regulation mit einer Permeabilitätsänderung der Zellmem- bran für bestimmte Komponenten des Kulturmediums gekoppelt ist.
Whitfield et al. (94) konnten kürzlich die Bedeutung der extrazellulären Calziumkonzentration für die Pro - liferation von Lymphozyten und Hühnerfibroblasten zeigen. Befunde von Frank (18) lassen erkennen, daß für die Stimulierung von Rattenfibroblasten neben den Serum - faktoren Ca^{2+}-und K^+-Ionen in Konzentrationen über 5×10^{-4} M bzw. 1×10^{-3} M im Medium vorhanden sein müssen. Die Aufnahme beider Ionen in die Zellen wird durch die Serumfaktoren gefördert, außerdem ist die intrazelluläre K^+-Konzentration von der Ca^{2+} -Konzen-

tration des Kulturmediums abhängig. Während die Serumfaktoren nur zu Beginn der Stimulierung im Medium anwesend sein müssen, dürfen die Mindestkonzentrationen der Ca^{2+} und K^{+} - Ionen selbst 16 Stunden nach " Triggerung " der Zellen nicht unter 5×10^{-4} M abfallen, damit nach 20 Stunden ein optimaler ^{3}H-Thymidineinbau gewährleistet ist. Dies scheint nicht vereinbar zu sein mit der Annahme, daß eine wichtige Funktion der Proteine in der Erhöhung der Membranpermeabilitäten für beide Ionen besteht. Zur Lösung des Widerspruchs könnten die Zellen einen größeren Vorrat an aktiven Serumfaktoren speichern, der sie während einiger Stunden von der Anwesenheit der Proteine im Serum unabhängig macht. Auch könnten während der ersten Stimulierungsschritte in den Zellen höhere Calzium und Kaliumkonzentrationen nötig sein als im weiteren Verlauf des Zellzyklus bis zur DNA-Synthese.

Parallel zum Einstrom von K^{+} und Ca^{2+} in die Zellen nach Serumzugabe ist auch die Aufnahme von Aminosäuren und Nukleosiden in die Zellen erhöht.

So konnten Hershko et al. (95) und Kram et al. (96) zeigen, daß bald nach Stimulierung der Zellen mit Serum Leucin und Uridin vermehrt in Protein und RNA eingebaut wird. Umgekehrt fällt der Einbau von Leucin und Uridin nach Serumentzug sofort ab und beträgt 20 Stunden später 30 Prozent bzw. 10 Prozent der Kontrollen.

Somit wird deutlich, daß die Serumfaktoren verschiedene

Vorgänge in den Zellen steuern, die gleichzeitig ab - laufen müssen und für die DNA-Synthese notwendig sind. Sehr wahrscheinlich werden diese Reaktionen über einen gemeinsamen Vermittler reguliert.

Burger (97) wies darauf hin, daß Membranveränderungen mit proteolytischen Enzymen kontaktinhibierte 3T3 Zellen zu neuen Zellrunden initiieren. So nahmen kontaktinhi - bierte 3T3 Zellen nach kurzzeitiger Behandlung mit 0,007 proz. Trypsinlösung bzw. 0,005 proz. Pronaselösung 24 Stunden später die DNA-Synthese auf. Hitzeinaktivier - tes Trypsin und Zugabe des Proteasehemmers Diisopropyl- fluorphosphat zur Trypsinlösung lösten keinen wachstums- stimulierenden Effekt aus.

Glynn und Mitarbeiter (98) dagegen fanden keinen DNA- Synthese stimulierenden Effekt nach 10 minütiger Be - handlung von kontaktinhibierten 3T3 Zellen mit 0,0005 proz. bis 0,004 proz. Pronaselösung. Über den untersuchten Zeit- raum von 84 Stunden blieb die Zellzahl konstant. Auch konnten sie eine Toxizität in der Pronaselösung ausschlie- ßen, da sich die Zellen nach Serumzugabe wieder zur DNA - Synthese stimulieren lassen. Da Glynn et al. aber auch unter gleichen Versuchsbedingungen wie bei Burger keine Zunahme der Zellzahl nachweisen konnten, ist eine Initiie- rung kontaktinhibierter 3T3 Zellen durch Proteasen wie Trypsin und Pronase unwahrscheinlich.

Beide Autoren berichten jedoch übereinstimmend, daß die

Agglutinierbarkeit von 3T3 Zellen mit Con A und anderen Pflanzenlektinen nach Pronasebehandlung von 25 Prozent bei den Kontrollen auf ca. 80 Prozent ansteigt. Umgekehrt zeigen transformierte Zellen wie Py 3T3 , SV 3T3 , Py BHK Zellen bei Zugabe von selektiven Proteaseinhibitoren nur eine schwache Agglutinierbarkeit (99). Die Veränderungen durch Proteasen und Proteaseinhibitoren müssen an den Zelloberflächen erfolgen, da Trypsin und Ovomucoid sowohl in löslicher Form wie auch nach Bindung an Sepharose den gleichen Effekt ausüben.
Auch Insulin behält , an Sepharose gekuppelt, bei epi - didymalen Fettzellen Transport-und antilipolytische Aktivität bei, obwohl es nicht in die Zellen eindringen kann (47).
Epitheliale Mammazellen der Maus akkumulieren α- Aminoisobuttersäure nach Stimulierung mit Insulin wie auch mit Insulinsepharose gleichermaßen. Im Lichtmikroskop konnte gegenüber Sepharose keine bevorzugte Bindung von Insulinsepharose an die Zellmembranen festgestellt werden. Vorübergehende, kurzzeitige Stoßkontakte genügen, um den biologischen Effekt auszulösen (100,101).
Ähnlich könnte auch bei der Stimulierung der DNA-Synthese mit ^{125}Jod-S_1 nur eine kurzzeitige Bindung an die Zellmembran die metabolischen Effekte verursachen, die zur Proliferation führen und auf spezifische Wechselwirkungen mit der Zellmembran zurückzuführen sind.

LITERATURVERZEICHNIS

1) Healy, G., M., Parker, R., C.; J. Cell Biology 30 (1966) 531

2) Eagle, H.; Science 130 (1959) 432

3) Frank, W., Ristow, H.J., Zabel, S.; Europ. J. Biochem. 14 (1970) 392

4) Todaro, G., J., Lazar, G., K., Green, H., J.; J. Cell Comp. Physiol. 66 (1965) 325

5) Dulbecco, R.; Nature 227 (1970) 802

6) Frank, W., Zabel, S.; Exptl. Cell Research 59 (1970) 186

7) Veser, J., Frank, W.; Z.Naturf. 27 b (1972) 1573

8) Hofmann, R., Ristow, H.J., Veser, J., Frank, W.; Exptl. Cell Research 85 (1973) 275

9) Frank, W., Ristow, H.J., Veser, J.; Z. Naturf. im Druck

10) Clarke, G., D., Stoker, M., G., P., Ludlow, A., Thornton, M.; Nature 227 (1970) 798

11) Lipton, A., Klinger, I., Paul, D., Holley, R.,W.; Proc. Nat. Acad. Sci US 68 (1971) 2799

12) Leffert, H., L., Paul, D.; J. Cell Physiol. 81 (1972) 113

13) Temin, H., M.; Int. J. Cancer 3 (1968) 491

14) Temin, H., M.; Int. J. Cancer 3 (1968) 771

15) Grimm, J., Frank, W.; Z. Naturf. 27 b (1972) 562

16) Grimm, J., Frank, W.; Europ. J. Biochem. 40 (1973) 555

17) Grimm, J., Frank, W.; Z.Naturf. Teil C, im Druck

18) Frank, W.; Z. Naturf. 28 c (1973) 322

19) Otten, J., Johnson, G., S., Pastan, J.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 44 (1971) 1192

20) Sheppard, J., R.; Proc. Nat. Acad. Sci US 68 (1971) 1316

21) Sheppard, J.. R.; Nature New Biology 236 (1972) 14

22) Otten, J., Bader, J., Johnson, G., S., Pastan, J.; J. biol. Chem. 247 (1972) 1632

23) Frank, W.; Exptl. Cell Research 71 (1972) 238

24) Dulbecco, R., Freeman, G.; Virology 8 (1959) 396

25) Marcus, P., J., Cieciura, S., J., Puck, T.,T.; J. Exptl. Med. 104 (1956) 615

26) Polinger, J., S.; Exptl. Cell Research 63 (1970) 78

27) Keck, R.; Arch. Biochem. Biophys. 63 (1956) 446

28) Fabricius, O., A; Microscop. Acta 71 (1972) 199

29) Scanu , A., Granada , J.L.; Biochemistry 5 (1966) 446

30) Alaupovic, P., Sanbar, S.S., Furman, R., H., Sullivan, M., L., Walraven, S., L.; Biochemistry 5 (1966) 4044

31) Hjerten, S.; BBA 31 (1959) 216

32) Tiselius, A., Hjerten, S., Levon, O.; Arch. Biochem. Biophys. 65 (1956) 132

33) Pregl - Roth, Quantitative org. Mikroanalyse

34) Edsall, J., T., Dandliker, W., B.; Fortschr. chem. Forsch. 2 (1951) 1

35) Stuart, H., A.; Die Physik der Hochpolymeren

36) Ornstein, L.; Annals N.Y. Acad. Sci 121 (1964) 321

37) Davis, B., J.; Annals N.Y. Acad. Sci 121 (1964) 404

38) Maurer, H., R.; Disc Electrophoresis and related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1971

39) Godson, G., N.; Analytical Biochemistry 35 (1970) 66

40) Schmincke, C.; Diplomarbeit, Tübingen, 1973

41) Williams, C.,A., Chase, M., W.; Methods in Immunology and Immunochemistry, New York, Academic Press, (1967) 315

42) Hunter, W., M., Greenwood, F., C.; Nature 194 (1962) 495

43) Greenwood, F., C., Hunter, W., M., Glover, J., S.; Biochemical Journal 89 (1963) 114

44) Mc Farlane, A., S.; Nature 182 (1958) 53

45) Zaitlin, M.; Pergamon Press, Immunochemistry 8 (1971) 569

46) Stahl, E.; Dünnschichtchromatographie

47) Cuatrecasas, P.; Biochemistry 63 (1969) 450

48) Axen, R., Porath, J., Ernback, S.; Nature 214 (1967) 1302

49) Cuatrecasas, P.; J. Biol. Chemistry 245 (1970) 3059

50) Heinzel, W., Grimminger, H., Kallee, E.;Diabetologia 7 (1971) 204

51) Hales, C., N., Randle, P., J.; Biochem. J. 88 (1963) 137

52) Pennisi, F.; J. Nucl. Biol. Med. 12 (1968) 137

53) Molinatti, G., M., Massara, F., Strumia, E., Pennisi, F., Scassellati, G.A., Vancheri, L.; J. Nucl. Biol. Med. 13 (1969) 26

54) Rodbell, M.; J. Biol. Chemistry 239 (1964) 375

55) Heptner, W., Christ,O.; Diabetologia 3 (1967) 443

56) Gliemann, J.; Diabetologia 3 (1967) 382

57) Weitzel, G., Renner, R., Guglielmi, H.; Hoppe Seyler's Z Physiol. Chem. 352 (1971) 1617

58) Rodbell, M.; J. Biol. Chem. 242 (1967) 5744

59) Hepp, K., D., Renner, R.; Febs L. 20 (1972) 191

60) Hepp, K., D., Edel, R., Wieland, O.; Europ. J. Biochem. 17 (1970) 171

61) Hepp, K., D.; Europ. J. Biochem. 31 (1972) 266

62) Johnson, A., J., Kline, D., L., Alkjaersig, N.; Thromb. et Diab. Haemorrh. 21 (1969) 259

63) Siegelman, A., Carlsen, A., S., Robertsen, T.; Arch. Biochem. 97 (1962) 159

64) Healy G., M., Parker, R., C.; J. Cell Biology 30 (1966) 539

65) Adham, N., F., Wilding, P., Mehl, J., Haverback, B., J.; J. Lab. Clin. Med. 71 (1968) 271

66) Dürr, H., K., Kallee, D.; Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 352 (1971) 629

67) Heimburger, N., Haupt, H., Schwick, H.; Proc. Int. Res. Conf., 1 - 22 , Walter de Gruyter, Berlin, New York

68) Frazier, W., A., Angeletti, R., H., Bradshaw, R., A., Science 176 (1972) 482

69) Temin, H., M.; J. Cell Physiol 69 (1967) 377

70) Hadden, D., R., Prout, T.,E.; Nature 202 (1964) 1342

71) Collipp, J., P., Kaplan, S., A.; BBA 117 (1966) 416

72) Berson, S., Yalow, R., S.; J. Biol. Chem. 241 (1966) 5745

73) Adham, N.,F., Chakmakjian, Z., H., Mehl, J., W., Bethune, J., E.; Arch. Biochem.Biophys. 132 (1969) 175

74) Hintz, R., L., Clemmons, D., R., Underwood, L., E., van Wyk, J., J.; Proc. Nat. Acad. Sci US 69 (1972) 2351

75) Houck, J., C., Cheng,R., F.; J. Cell Physiol. 81 (1973) 257

76) Lipton, A., Paul,D., Henahan, M., Klinger, J., Holley, R.,W.; Exptl. Cell Research 74 (1972) 466

77) Pierson, R.,W., Temin, H., M.; J. Cell Physiol. 79 (1971) 319

78) Renner, R., Hepp, K.D., Humbel, R.,E., Froesch, E., R.; Horm. metab. Research 5 (1973) 56

79) Birnbaumer, L., Rodbell, M.; J. Biol. Chem. 244 (1969) 3477

80) Renner, R., Hepp, K., D.,and Veser, J., Frank, W.; Exptl. Cell Research in press

81) Nagasawa, S., Sugihara,S., Han, B.,H., Suzuki, T.; J. Biochem. 67 (1970) 809

82) Nagasawa, S., Sugihara, S., Han, B., H., Suzuki, T.; J. Biochem. 67 (1970) 821

83) Barett, A., J., Starkey, P., M.; Biochem. J. 133 (1973) 709

84) Bürgi, H., Müller,W.,A., Humbel, R.,E., Lebhart, A., Froesch, E., R.; BBA 121 (1966) 349

85) Hammarström,S., Samuelson, B., Bjursell, G.; Nature New Biology 243 (1973) 50

86) Kram, R., Tomkins, G., M.; Proc. Nat. Acad. Sci US 70 (1973) 1659

87) Asua, L., J., Surian, E.,S., Flawia, M., M., Torres, H., N.; Proc. Nat. Acad. Sci US 70 (1973) 1388

88) Horton, E.,W.; Hypotheses on physiological roles of prostaglandines, Physiol. Rev. 49 (1969) 122

89) Mc Manus, J., P., Whitfield, J., F., Youdale, T.; Exptl. Cell Research 53 (1968) 155

90) Paul,D., Lipton, A., Klinger, J.; Proc. Nat. Acad. Sci US 68 (1971) 645

91) Morley, C., G., D., Kingdon, H., S.; BBA 308 (1973) 260

92) Hülser, D., F., Frank, W.; Z. Naturf. 26 B (1971) 1045

93) Ristow, H.J., Frank, W., Fröhlich, M.; Z. Naturf. 28 C (1973) 188

94) Whitfield, J., F., Mc Manus, J., P., Braceland, B., M., Gillan, D., J.; J. Cell Physiol. 79 (1972) 353

95) Hershko, A., Mamont, P., Shields, R., Tomkins, G.; Nature New Biology 232 (1971) 206

96) Kram, R., Mamont, P., Tomkins, G.,M.; Proc. Nat. Acad. Sci US 70 (1973) 1432

97) Burger, M., M.; Nature 227 (1970) 170

98) Glynn, R.,D., Trash, C., R., Cunningham, D.,D.; Proc. Nat. Acad. Sci US 70 (1973) 2676

99) Schnebli, H.,P., Burger, M., M.; Proc. Nat. Acad. Sci US 69 (1972) 3825

100) Oka, T., Topper, Y., J.; Nature New Biology 239 (1972) 216

101) -Selinger, R.,C., L., Civen.,M.; Biochem. Biophys. Research Commun. 43 (1971) 793

LEBENSLAUF

Name	:	Joseph Johannes Veser
Geburtstag	:	3. 9. 1945
Geburtsort	:	Laupheim, Krs. Biberach
Staatsan - gehörigkeit	:	deutsch
Konfession	:	röm. kath.
Ausbildung	:	1952 - 1956 Volksschule Laupheim 1956 - 1958 Progymnasium Laupheim 1958 - 1965 humanistisches Gymnasium Ehingen / Do. 1965 Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen 1965 - 1967 allgemeine Wehrpflicht 1967 - 1972 Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen 1972 - 1973 experimenteller Teil der März - Okt. Dissertation am Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, unter Anleitung von Professor Dr.Dr. W.Frank
Examina	:	März 1968 Vordiplom 1. Teil Okt. 1969 Vordiplom 2. Teil März 1972 Diplom

Meine akademischen Lehrer waren :

Dr. E. Bayer
Dr. E. Bünning
Dr. W. Frank
Dr. H. Friedrich-Freksa
Dr. A. Gierer
Dr. H. Krüger
Dr. H. Mauser
Dr. E. Müller
Dr. H. Remmer
Dr. W. Rüdorff
Dr. F. Schneider
Dr. W. Voelter
Dr. G. Weitzel